

THESIS

MUNICH

1967

GRENZEN UND MÖGLICHKEITEN
DER KÄLTEKONSERVIERUNG
VON GEWEBEN UND ORGANEN

Roswitha vor dem Brocke

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. R. Zenker

GRENZEN UND MÖGLICHKEITEN
DER KÄLTEKONSERVIERUNG
VON GEWEBEN UND ORGANEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Roswitha vor dem Brocke
aus Soest

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. SCHMIDT-MENDE
Mitberichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. R. ZENKER
Dekan: Professor Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 21.2.1967

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. HYPOTHERMIE UND STOFFWECHSEL	2
III. EINFLUSS DER HYPOTHERMIE AUF LEBENDE ZELLEN UND GEWEBE	4
1. Veränderungen oberhalb des Gefrierpunktes	4
2. Phasenwechsel	4
a) Heterogene Kristallisation	6
b) Homogene Kristallisation	7
c) Vitrifikation	7
3. Zellschäden und ihre Ursachen	8
a) Kälteschock	9
b) Mechanische Kompression und Zellruptur	10
c) Elektrolytkonzentration	11
d) Eiskristallisation	14
e) Rekristallisation	16
4. Diskussion	17
IV. MÖGLICHKEITEN DER VERHINDERUNG VON GEFRIER- SCHÄDEN	19
1. Schutzmechanismus bei winterharten Pflanzen, kälteunempfindlichen Insekten und anderen Organismen	19
2. Gefrierschutzmittel	20
a) Glycerin	20
b) Dimethylsulfoxyd	22
c) Andere Schutzsubstanzen	23
3. Gefrierschutz durch mechanische Gefrierpunkts- erniedrigung	25
4. Diskussion	26
V. METHODEN DER KÜHLUNG, LAGERUNG UND ERWÄRMUNG	28
1. Wärmeleitung durch Kontakt	28

2. Wärmestrahlung	29
3. Diathermie	29
4. Anwendung von Druck	30
5. Wärmezufuhr durch Perfusion	30
6. Gefriertrocknen	31
7. Diskussion	35
VI. REAKTION DER ZELLEN, GEWEBE UND ORGANE	37
1. Zellen	37
a) Blutzellen	37
b) Spermien	39
2. Gewebe	41
a) Knochen, Knorpel	41
b) Arterien	41
c) Nerven	42
d) Haut	42
e) Cornea	42
f) Muskulatur	43
g) Tumoren	44
h) Knochenmark	44
3. Organe	45
a) Nebenniere	45
b) Nebenschilddrüse	45
c) Schilddrüse	46
d) Ovar	46
e) Herz	46
f) Niere	47
g) Leber	51
4. Diskussion	51
VII. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	55
LITERATURVERZEICHNIS	59

I. EINLEITUNG

In den letzten Jahren ist die Bedeutung der Transplantation von Geweben und Organen in der chirurgischen Tätigkeit immer größer geworden. Mit diesem Verfahren sind zwei Probleme in den Vordergrund getreten: das immunbiologische Problem und das der Konservierung und damit der Überbrückung der Ischämiephase. Die Ischämietoleranz der einzelnen Gewebe ist unterschiedlich. Die bradytrophen Gewebe haben einen verlangsamten Stoffwechsel, so daß sie die Zeit, in der der Kreislauf unterbrochen ist und die Zufuhr von Sauerstoff nicht erfolgt, besser als die normotrophen Gewebe überstehen. Daher ist die Transplantation bradytropher Gewebe und Organe wie Knochen, Knorpel, Arterien und Haut schon seit langer Zeit möglich und zur Routine geworden.

Das Problem der Übertragung normotropher Gewebe dagegen ist noch nicht gelöst. Diese Gewebe stellen an den Stoffwechsel höhere Anforderungen und tolerieren eine Ischämie weniger gut. Entscheidend für die Erhaltung des Organs oder Gewebes sind die Dauer der Anoxie und die während dieser Zeit ablaufenden Stoffwechselvorgänge. Beide Faktoren werden ausgedrückt in der Wiederbelebenszeit, d. h. der Zeit, in der das Organ aus dem Kreislauf ausgeschaltet werden kann, ohne irreversible Schäden zu erleiden (99).

Die Ischämietoleranz ist stoffwechselabhängig. Da der Stoffwechsel wiederum von der Temperatur beeinflusst wird und entsprechend der RGT-Regel mit sinkender Temperatur abnimmt, muß die Anwendung der Hypothermie eine Verlängerung der Wiederbelebenszeit bewirken und die Konservierung von Geweben und Organen mit höheren Stoffwechselanforderungen ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit zeigt in ihrem ersten Teil die Abhängigkeit und die Veränderungen des Stoffwechsels bei sinkender Temperatur auf. Im zweiten Teil werden die hypothermischen Veränderungen der Wasser- und Elektrolytverhältnisse in Zellen und Geweben oberhalb des Gefrierpunktes, während und nach dem Phasenwechsel dargestellt. Weiterhin werden die Zellschäden auf ihre Ursachen untersucht und ihre verschiedenen Theorien aufgezeichnet. Im dritten Teil der Arbeit werden die Möglichkeiten des Gefrierschutzes, der in der Anwendung sogenannter Gefrierschutzmittel und in mechanischer Gefrierpunktsenkung besteht, dargelegt. Nach der Beschreibung der Kühlungs-, Lagerungs- und Erwärmungsmethoden, bei der das Verfahren des Gefriertrocknens besonders berücksichtigt ist, wird die Reaktion der verschiedenen Zellen und Gewebe auf die hypothermischen Veränderungen dargestellt. Eine besondere Beachtung finden die Versuche zur Kühlkonservierung der Niere. Zum Schluß werden die Erfolge bisheriger Forschung in Hinsicht auf die Möglichkeiten und Grenzen der Kältekonservierung diskutiert.

II. HYPOTHERMIE UND STOFFWECHSEL

Sämtliche Organismen entnehmen die für die Aufrechterhaltung ihrer Funktionen nötige Energie aerob oder anaerob verlaufenden Abbauvorgängen an ihren chemischen Bausteinen. Diese Energie kann vollständig nur unter Verbrauch von Sauerstoff, also durch Verbrennungsvorgänge gewonnen werden. Daher kann die Menge des verbrauchten Sauerstoffs als Maß für die Stoffwechselvorgänge dienen.

Wird nun der Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Temperatur gesetzt, wo zeigt sich eine exponentielle Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bei Körpertemperaturniedrigung (116). Dieses trifft für den Gesamtorganismus wie auch für das isolierte Organ zu. Bei Versuchen an Hunden stellten BERGSTRAND und STERKY (10) bei einer Körpertemperatur von $18 - 20^{\circ}\text{C}$ einen Sauerstoffverbrauch von 27 % des Normalwertes fest. LEVY fand an der isolierten Niere bei derselben Temperatur einen Wert von 18 %. Eine auf eine innere Temperatur von 30°C gekühlte Niere hatte einen Sauerstoffverbrauch von 43 %, bei einer Rindentemperatur von $4 - 5^{\circ}\text{C}$ nur noch 5 % des Normalwertes (54).

Eine Erniedrigung des aeroben wie des anaeroben Stoffwechsels bei Temperatursenkung wies SCHMIDT - MENDE (98) an der isolierten, anoxischen Kaninchenniere nach, indem er die ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen und den Lactat-Pyruvat-Quotienten bei verschiedenen Temperaturen bestimmte. Er fand, daß sowohl der Abbau des energiereichen ATP als auch die anaerobe Glykolyse mit sinkender Temperatur stark verlangsamt ablaufen. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Stoffwechselaktivität bei 4°C und bei -4°C , und selbst bei -25°C konnten die Stoffwechselvorgänge quantitativ nachgewiesen werden. Doch waren sie schon erheblich reduziert. Bei Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit des durch Hypothermie verlangsamen Zellstoffwechsels fand SCHMIDT - MENDE (98), daß die ATP-Konzentration vom 1. bis zum 6. Lagertag nur geringfügig abgenommen hatte. PARTMANN (80) untersuchte die ATP-Spaltung in ihrer Temperatur- und Zeitabhängigkeit am Rindermuskel und stellte fest, daß nach einer Lagerzeit von einem halben Jahr bei einer Temperatur von -24°C noch 50 % des Normalwertes an energiereichem Phosphat vorhanden war.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß die Herabsetzung der Stoffwechselaktivität durch Hypothermie die Möglichkeit der ischämischen Schädigung des Gewebes einschränkt und damit die Überlebenschancen und die Anwendbarkeit als Transplantat verbessert. Da die Stoffwechselvorgänge mit fallender Temperatur reduziert werden, muß eine möglichst schnelle und intensive Temperatursenkung erreicht werden.

Wie in dem vorhergehenden Abschnitt dargestellt wurde, führt die Temperaturniedrigung zwar zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit der

enzymatischen Vorgänge in der Zelle, doch ist der Temperaturkoeffizient für die einzelnen Reaktionen nicht gleich. Die Unterschiede sind nur gering, aber bei einer Temperatursenkung von 20°C und mehr kommt es zu einer erheblichen Divergenz der Geschwindigkeiten, so daß eine normale Koordination der Zellvorgänge nicht mehr möglich ist (105 und 116). PARTMANN (81) sieht die Ursache dafür nicht nur in der Temperaturniedrigung selbst, sondern vor allen Dingen in den mit dem Gefrieren verbundenen Änderungen des Reaktionsmilieus wie Verminderung der wässrigen Phase, Zunahme der Ionenkonzentration und pH-Veränderung und des Enzymzustandes.

Da die Reaktionsketten und -zyklen im Stoffwechsel gestört sind, resultiert daraus eine Anhäufung toxischer Produkte. Wird die Temperatur nicht genügend gesenkt, d.h. unter -70°C , kommt es nach JOSLYN (45) zur Autointoxikation und zur Verkürzung der Lebensdauer.

Auch bei Nahrungsmitteln fand KÜHNAU (51) eine Dysregulation der Enzymvorgänge bei Tiefkühlung. Einige Prozesse wie die Triglyceridspaltung und die Oxydation der Ascorbinsäure werden bis zum völligen Verschwinden abgestoppt, andere laufen in beschränktem Umfang weiter ab. Es treten aber auch neuartige, qualitativ abweichende Stoffwechselvorgänge auf. Bestimmte Enzyme nehmen an Aktivität zu, da durch die Eisbildung die Salzkonzentration erhöht und für diese Fermente ein optimales Reaktionsmilieu geschaffen wird. Zu diesen "osmophilen" Enzymen gehören Peroxydasen und Katalasen.

Im lebenden Organismus spielen sich fermentative Umsetzungen auch außerhalb der wässrigen Phase ab, vor allem in der lipoiden Phase. Diese in nicht wässrigem Milieu wirksamen Enzyme finden gerade bei sehr tiefen Temperaturen optimale Wirkungsbedingungen vor, wie CALVIN (117) bei der Spinatphosphatase gezeigt hat.

Ob und inwieweit diese hypothermischen Veränderungen der Fermentaktivität, die von KÜHNAU (51) aufgezeigt wurden, auf tierisches und menschliches Gewebe übertragen werden können, bleibt offen. Sicher ist, daß es auch in diesen Geweben zu dysregulatorischen, durch die Hypothermie bedingten Schädigungen kommt, daß diese aber im Vergleich zu den normothermischen Anoxieschäden ganz gering sind. So bleibt die Forderung, die zu konservierenden Organe schnell und tief zu kühlen, bestehen, da in der Hypothermie die einzige Möglichkeit zur Verlängerung der Wiederbelebungszeit und damit zur Lang- und Kurzzeitkonservierung von Geweben und Organen gesehen wird.

III. EINFLUSS DER HYPOTHERMIE AUF LEBENDE ZELLEN UND GEWEBE

1. VERÄNDERUNGEN OBERHALB DES GEFRIERPUNKTES

Die Senkung der Temperatur in einem wässrigen System - auch die Gewebe gehören letztlich dazu - bewirkt eine Vielzahl von Veränderungen. Alle können auf eine einzige zurückgeführt werden: die Verringerung der kinetischen Energie der Moleküle.

Durch den Wärmeentzug aus der Flüssigkeit, der nach RINFRET (89) die 1. Stufe der Wärmereduktion beim Kühlvorgang darstellt, werden die Moleküle verlangsamt. Es kommt zu einer Reduktion des Dampfdruckes, zu einer Zunahme der Viskosität des Wassers und, wie im vorhergehenden Abschnitt ausführlicher gezeigt wurde, zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Prozesse. Das Ausmaß all dieser Veränderungen ist der Temperatursenkung direkt proportional. Diese Wirkungen zeigen sich nicht nur an dem Lösungsmittel und an den darin gelösten Molekülen, sondern auch an den Molekülen innerhalb der Zellen, die von den andern durch Membranen mit einer hohen spezifischen Permeabilität für die verschiedenen molekularen Gruppen getrennt sind (70).

Nach weiterer Kühlung tritt die wichtigste physikalische Veränderung der Hypothermie ein, der Phasenwechsel. Beim Übergang der flüssigen Phase in die feste wird die latente Wärme von 80 cal/g frei, und damit ist die zweite Stufe der Wärmereduktion erreicht. Bei der dritten verringert sich der Wärmegehalt der festen Masse entsprechend der Temperaturenniedrigung (89).

2. PHASENWECHSEL

Die Senkung der Temperatur unter den Gefrierpunkt führt zur Eisbildung des Gewebswassers, das quantitativ und qualitativ der Hauptbestandteil des lebenden Gewebes ist. Das vorhandene Wasser kommt in freier und gebundener Form vor. Das fest gebundene Wasser, das etwa 8 - 10 % des Wassergehaltes bei Säugertiergeweben ausmacht, gefriert nie. LUYET (63) teilt das in lebendem Gewebe vorhandene Wasser in fünf Gruppen ein:

1. excess water
2. metabolic water
3. vital water
4. remnant freezable water
5. unfreezable water

Der Entzug des "excess" und "metabolic water" ist ohne Schädigung der Zellen

möglich, während die Entfernung des "vital water" zum Zelltod führt. Das restliche gefrierfähige Gewebwasser gefriert erst nach dem Tode, das "unfreezable water" gefriert nie.

Die Erstarrung der wässrigen Lösungen, in denen sich die Gewebszellen befinden und sich alle biologischen Prozesse abspielen, vollzieht sich nach LUYET (65) in zwei Schritten. Den Vorgang, bei dem das Lösungsmittel, also Wasser, gefriert, nennt er primäre Kristallisation. Dabei erhöht sich durch den Wasserentzug die Salzkonzentration. Unter sekundärer Kristallisation versteht er die Verdichtung der gelösten Stoffe in der nun konzentrierten Lösung.

Voraussetzung für die Kristallisation ist die Bildung von Keimzentren. Die Zahl der Keimzentren, ihre Verteilung und ihr Wachstum hängen von verschiedenen inneren und äußeren Faktoren ab. Die inneren leiten sich von der Natur des Systems ab, von seinem Wassergehalt, seiner Struktur, von der Art und Konzentration der gelösten Stoffe und der dispersen Phase. Die äußeren Faktoren umfassen absolute Temperatur und spezifische Wärme der Kältequelle und die Art des thermischen Kontaktes zwischen dem Präparat und dem Kühlsystem. Aus dem Zusammenwirken dieser Faktoren resultieren Gefrierkurve und Struktur des gefrorenen Körpers, die sich bei den verschiedenen Stoffen stark unterscheiden (88).

LUYET (65) untersuchte die Bildung und Struktur der Eiskristalle in Abhängigkeit von der Kühlgeschwindigkeit und der Art der Lösung. Die polaren Wassermoleküle verbinden sich miteinander und bilden Kristallisationszentren: Ketten, Tetraeder und hexagonale Formen. Diese Kristallkerne wachsen weiter zu hexagonalen Prismen, Sternen und Rosetten an. Bei niedriger Kühlrate haben die Moleküle genügend Zeit, ihre Stellung innerhalb der Struktur einzunehmen. Nimmt die Gefriergeschwindigkeit zu, so bilden sich irreguläre und Mischformen von Dendriten und Sphärolithen. Kristallisieren bei der sekundären Kristallisation die gelösten Stoffe oder ihre Hydrate aus, so entstehen unendlich kleine Sphärolithe, irreguläre Dendrite, gelappte Rosetten und Polyeder.

Die Untersuchungen von LUYET zeigen, daß der Kristallisationsvorgang zu einer festen Ordnung innerhalb des Systems führt.

Die sonst sich zufällig und frei bewegenden Moleküle werden auf Grund der Abnahme ihrer kinetischen Energie in eine bestimmte Anordnung gebracht und dort fixiert. Je größer die Temperatursenkung ist, desto mehr Moleküle lagern sich den Kristallen an. Da bei der Kristallisation latente Wärme frei wird, wird die Kühlung verzögert. Die Temperatur steigt sogar etwas an. Das Wachstum der Kristalle wird insofern erschwert, als die Wassermoleküle die umgebende Wärmezone durchqueren müssen. In einer kolloidalen Lösung wird die Schwierigkeit noch dadurch erhöht, daß die Kolloidteilchen eine mehr oder weniger dichte Hülle um die Kristalle bilden. So ist die Wachstumsrate in einer

kolloidalen Lösung im Vergleich zum Wasser wesentlich niedriger (112).

Entscheidend für die Größe und Zahl der Kristallkerne und ihr Wachstum außerhalb oder in der Zelle ist die Kühlrate. Diese ist abhängig von der Größe des Präparates, seinen Wärmeeigenschaften, von der Schnelligkeit des Eintauchens, wenn es sich um eine Kühlflüssigkeit handelt, und von der Temperatur und den physikalischen Eigenschaften des Kühlsystems. Entsprechend der Kühlgeschwindigkeit kommt es zur heterogenen Kristallisation, zur homogenen Eisbildung oder zur Vitrifikation. Bei Kühlraten von 1°C/min und weniger können die molekularen Einschlüsse der Lösung heterogen eine Kristallbildung induzieren. Bei einer Temperaturerniedrigung von $50 - 100^{\circ}\text{C/min}$ entwickeln sich zahllose winzige Kristalle um intra- und extrazelluläre Wassermolekülgruppen als homogene Kristallisationszentren. Um eine Vitrifikation zu erreichen, sind Kühlgeschwindigkeiten von $200 - 1000^{\circ}\text{C/sec}$ und darüber erforderlich.

a) Heterogene Kristallisation

Bei langsamer Temperaturerniedrigung unter den Gefrierpunkt setzt in den Geweben und Zellsuspensionen eine extrazelluläre Kristallbildung ein. Die Eiskristalle wachsen in den Interzellularräumen an und umschließen die großmolekularen, nicht wässerigen Substanzen. Sie werden umso größer, je langsamer das Kühlen erfolgt. Da der Dampfdruck des Eises erniedrigt ist, wandert das umgebende Wasser aus den Zellen aus. Nach MERYMAN (73) bedeutet Gefrieren letztlich Dehydratation. Durch den Wasserentzug steigt die Salzkonzentration in den dehydrierten Zellen an, und der Gefrierpunkt sinkt. Trotz fallender Temperatur tritt keine intrazelluläre Kristallisation ein. Die Zellmembran scheint eine Schranke gegen das Eindringen von Eiskristallen zu bilden (105). So konnte das Protoplasma von Froschmuskelfasern auf -10°C unterkühlt werden, obwohl das umgebende Medium schon bei $-1,2^{\circ}\text{C}$ gefroren war. Auch die Zellmembran der Amöben verhinderte eine intrazelluläre Eisbildung, die nur durch Beimpfen mit einem Kristall erreicht wurde oder spontan bei -79°C eintrat (105).

Daß heterogene Kristallisation und extrazelluläre Eisbildung nicht gleichgesetzt werden können, zeigen Ergebnisse mikroskopischer Untersuchungen von HEARD (35), der durch langsames Einfrieren auf -79°C und anschließende Fixation mit Alkohol Dauerpräparate gefrorener Rattengewebe herstellte. HEARD fand die Gewebe stark verändert. Es hatten sich große und zahlreiche Eiskristalle gebildet, die in weichen Organen wie Leber und Milz unregelmäßig, im quergestreiften Muskel und im Fasergewebe entsprechend der Gewebestrukturen angeordnet waren. Die Kristalle kamen sogar in den Zellkernen vor, deren Inhalt sie an die Kernmembran drückten. Nach langsamem Gefrieren und schnellem Auftauen erschien das Gewebe fast normal. Nur in einigen Kernen waren noch

Spuren der Eiskristallbildung zu finden.

So kann die Auffassung, bei heterogener Kristallisation finde ausschließlich eine extrazelluläre Eisbildung statt, nicht mehr aufrechterhalten werden. Obwohl bei den meisten Geweben nur extrazelluläres Eis nachgewiesen wurde, führten die Untersuchungsergebnisse HEARDS A. U. SMITH (106) zu folgender Überlegung. Ein Teil der Zellen wird durch den Wasserentzug aus dem Cytoplasma progressiv dehydriert, bis sich kein intrazelluläres Eis mehr bilden kann. Andere Zellen jedoch werden nur teilweise dehydriert, so daß schließlich bei genügend tiefer Temperatur das restliche freie Zellwasser auskristallisieren kann. Die Eiskristalle können sich im Kern und im Cytoplasma bilden.

Sowohl die ausschließliche extrazelluläre als auch die intrazelluläre Kristallisation bewirken beim langsamen Gefrierprozeß den Zelltod. Nur wenige Säugetierzellen wie Nebenschilddrüsen-, Amnion- und Schleimzellen (50) überleben diesen Vorgang.

b) Homogene Kristallisation

Wenn lebende Zellen und Gewebe schnell auf tiefe Temperaturen gekühlt werden, tritt die Eisbildung gleichzeitig in den Zellen und im umgebenden Medium oder in der Gewebsflüssigkeit ein. Die Größe der Kristallkerne ist umgekehrt proportional der Zahl der Eiskristalle und nimmt mit fallender Temperatur ab. Am Nullpunkt sind sie noch unendlich groß, bei -100°C liegen sie im Bereich der Molekülgröße. Im Wasser setzt die homogene Kernbildung bei oder unter -39°C , der unteren Grenze der Unterkühlung, ein (46). Unter Unterkühlung versteht man die Temperaturerniedrigung in einer Flüssigkeit unter ihren Gefrierpunkt, ohne daß eine Kristallisation eintritt.

Das einzige Säugetiergewebe, das nach homogener Kristallisation wieder hergestellt ist, sind die roten Blutkörperchen, wahrscheinlich wegen ihrer geringen Größe oder ihrer Armut an Zellorganellen. Strukturiere Zellen werden durch die intrazelluläre Kristallisation geschädigt oder getötet. Ob und inwieweit die Eisbildung in den Zellen Ursache des Zelltodes ist, soll in einem folgenden Kapitel diskutiert werden.

c) Vitrifikation

Vitrifikation, die Umformung des Wassers in eine amorphe, glasartige Masse, vollzieht sich dann, wenn der relativ enge Temperaturbereich der Kristallisation ultraschnell durchschritten und die Moleküle in ihren ursprünglichen, zufälligen Stellungen fixiert werden und eine amorphe, feste Substanz bilden. LUYET (63, 64) nahm an, daß der Zelltod vermieden werden kann, wenn das

Protoplasma in diesem Zustand und wieder heraus ohne intrazelluläre Kristallbildung gebracht wird. Er fand, daß der kritische Temperaturbereich, in dem der Zelltod eintritt, identisch ist mit dem, in dem sich die Eiskristallisation vollzieht. In bestimmten Fällen bleiben die Zellen, die in dünnen Filmen und Tropfen bei einer Kühlgeschwindigkeit von 100°C/sec auf -196°C gefroren werden, lebensfähig. LUYET gefror auf diese Art Froschspermien in dünnen Filmen, die durchsichtig blieben, und nahm an, daß eine Vitrifikation eingetreten sei. Später erkannte er auf Grund von elektronenmikroskopischen und Röntgenstrahlenuntersuchungen, daß eine Erstarrung im amorphen Zustand ohne Kristallbildung in den Zellen nicht zu erreichen ist (65).

Das durchsichtige, glasige Material besteht aus einer geordneten Phase, den Kristalliten, die zufällig und regellos in einem nicht geordneten Medium verteilt sind. Diese Kristallite sind typische Polyeder, Bänder und Bündel von Molekülen und Atomen. FERNANDEZ - MORAN (29) untersuchte elektronenmikroskopisch die Bildung dieser Kristallite. Er sah, daß bei -120°C erste Partikel mit einem Durchmesser von $20 - 50 \text{ \AA}$ auftreten, die dann schnell auf $50 - 100 \text{ \AA}$ anwachsen und Zeichen kristallinischer Anordnung aufweisen. Nach ein paar Minuten erreichen die hexagonalen Mikrokristalle eine Größenordnung von Mikroneinheiten.

Auf das Vorhandensein von Mikrokristallen im glasigen Präparat deutet die "migratory recrystallisation" während des Auftauens hin, die Bildung großer Kristalle auf Kosten der kleinen. Wird ein durchsichtiges, ultraschnell gekühltes Präparat erwärmt, so wird es plötzlich opak.

Die Tatsache, daß mit steigender Temperatur eine Wanderung der Wassermoleküle von kleinen Kristalliten auf größere einsetzt und so ein Wachstum der Kristalle bis in den mikroskopischen Bereich ermöglicht wird, beweist, daß selbst im durchsichtigen Präparat sich kristallinische Strukturen befinden. Der sichere Nachweis der Mikrokristalle kann nur mit Hilfe von Röntgenstrahlen und Elektronenmikroskopie erbracht werden.

Diese Untersuchungsmethoden haben gezeigt, daß eine echte Vitrifikation nur in hoch destilliertem Wasser, nicht in zellulärem Milieu stattfinden kann. Mit unseren heutigen Methoden des schnellen Gefrierens können wir den Kristallisationsprozeß nur einschränken, ihn aber nicht verhindern.

3. ZELLSCHÄDEN UND IHRE URSACHEN

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten die unterschiedlichen Reaktionen der Zellen und Gewebe auf die verschiedenen Vorgänge der Temperaturerniedrigung dargestellt worden sind, sollen nun die Zellschäden auf ihre Art und ihre Ursachen untersucht werden.

a) Kälteschock

Viel organisches und biochemisches Material bleibt beim Gefrieren unverändert, wenn die Kühlrate schnell oder ultraschnell und die Lagertemperatur tief ist. Mikroskopisch zeigen einige Gewebstücke nach schnellem Gefrieren keine Veränderungen. Die Mehrzahl der Säugergewebe jedoch ist nach schnellem Gefrieren und Lagern bei tiefer Temperatur nicht mehr lebensfähig. Der Grund dafür ist die Empfindlichkeit der meisten lebenden Zellen gegenüber dem Kälteschock.

Nach SMITH (105) wird der Kälteschock - diese Bezeichnung ersetzt den von MILANOW 1934 geprägten Ausdruck Temperaturschock - verursacht durch einen plötzlichen Temperaturabfall auf subnormale Temperaturen über 0°C oder auf tiefe Temperaturen unter 0°C . Er wirkt schädigend oder tödlich auf eine Vielzahl von lebenden Einzelzellen und Geweben, während eine stufenweise Temperaturniedrigung auf dieselbe Endtemperatur unschädlich ist. Dieses Phänomen zeigt sich bei Algen, Bakterien, Protozoen, Spermien, Mäuseleukämiezellen, bei Haut-, Ovarial-, Hoden- und Nebennierenrindengewebe. Ausnahmen bilden einige Tumorzellen, Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsen-gewebe.

So fanden RUSSEL und M. (95) bei Autotransplantation von Nebenschilddrüsen in Ratten, daß nach ultraschnellem Gefrieren und Konservierung auf -195°C für 21 Tage 50 % der Organe eine - allerdings schwache und verzögerte - Stoffwechselaktivität zeigten. Die histologische Untersuchung ergab, daß einige Zellen der Peripherie ein normales Aussehen hatten.

Die Ursachen des Kälteschocks sind noch nicht geklärt. SMITH (105) sieht die schädigenden Wirkungen der plötzlichen Temperaturniedrigung in der Störung des dynamischen Gleichgewichts zwischen Zellinnerem und Medium, in der intrazellulären Eiskristallbildung und in dem osmotischen Schock.

Während sich die biochemischen Reaktionen bei Temperaturabfall unvermeidlich in Gleichgewicht und Ausmaß ändern, bleibt die Diffusion bis zu tiefen Temperaturen gleich stark. Die daraus resultierende Störung des dynamischen Equilibriums der Zellen bewirkt eine irreversible Schädigung. Bei langsamer Kühlung dagegen kann es zu einer Anpassung an den veränderten Milieuzustand kommen.

Die intrazelluläre Eisbildung bei schnellem Temperaturabfall ist dadurch bedingt, daß das Zellwasser nicht genügend rasch in das hypertonische extrazelluläre Medium gelangt. Die Bedeutung des langsamen Kühlens liegt darin, daß es die Unterkühlung der Zellen begünstigt und die intrazelluläre Kristallisation verhindert bzw. verzögert.

Die dritte Ursache des Kälteschocks, die SMITH angibt, ist der osmoti-

sche Schock, dem die Zellen in dem stark konzentrierten Medium unterworfen sind und der sich bei Spermien im Verlust der Beweglichkeit und bei Erythrocyten in der Hämolyse zeigt. Durch langsames Kühlen wird auch der osmotische Schock verringert.

Wie PHILLIPS und LARDY (84) 1940 feststellten, nimmt die Empfindlichkeit von Bullensamen gegenüber dem Kälteschock durch Zugabe von Eidotter, in dem Lecithin die eigentliche Schutzsubstanz ist, ab. Lecithin verhindert ein Bersten der Zellmembran durch das zunehmende intrazelluläre Eis dadurch, daß es in die Zellwand eingebaut wird und ein Nachgeben der Membran bewirkt. Entscheidend ist nicht die absolute zugeführte Menge, sondern eine Zunahme des Verhältnisses von Lecithin zu Cholesterin zugunsten des Lecithins. LOVELOCK (60) erhielt bei Versuchen mit Erythrocyten ähnliche Befunde und schloß daraus, daß die Zellmembran Sitz der Schädigung durch den Kälteschock ist. Diese Hypothese erklärt auch das Fehlen des Kälteschocks bei schnellem Erwärmen; denn die Zellmembran übersteht eine Verletzung bei Kompression besser als bei Ausdehnung.

Obwohl die Ursachen des Kälteschocks, die von SMITH und LOVELOCK genannt werden, zuerst gegensätzlich erscheinen, zeigt sich, daß sie sich zum Teil gegenseitig erklären und bedingen. So verursacht die intrazelluläre Eiskristallbildung außer den rein temperaturbedingten Veränderungen der Lipotide die Schäden der Zellmembran. Diese können wiederum für die Störung des dynamischen Gleichgewichts verantwortlich sein. Die schnell ansteigende extrazelluläre Salzkonzentration kann zu Veränderungen der chemischen Struktur der Zellen und damit zu Störungen im Stoffwechsel führen.

Doch sind alle diese Überlegungen rein hypothetisch. Das Problem der eigentlichen Ursache der Schäden, die durch den Temperaturschock verursacht werden, ist noch ungeklärt.

b) Mechanische Kompression und Zellruptur

Eine lange vertretene Ansicht über die Ursache des Zelltodes war die der mechanischen Kompression durch extrazelluläres Eis. Da früher unter gewöhnlichen Bedingungen nur eine extrazelluläre Kristallisation beobachtet wurde, nahm man an, die wachsenden Eiskristalle drückten die Zellen so stark zusammen, bis es zur Ruptur käme (105, 106).

Diese Theorie wurde solange aufrechterhalten, bis SMITH und M. (109) 1951 bewiesen, daß Amöben einem hydrostatischen Druck von mehreren hundert Atü ohne Schaden standhalten. JAKOB und WEBB (43) zeigten, daß Erythrocyten bei erniedrigter Temperatur einem Druck von 2110 kg/cm^2 und bei Zimmertemperatur einem Druck von 3510 kg/cm^2 widerstehen. Auch die Annahme,

die scharfen und spitzen extrazellulären Kristalle durchbohrten die Zellmembran, hat sich als falsch erwiesen. HEARD (35) fand in seinen Gefrierpräparaten stäbchenförmige Kristalle, die abgerundet und an den Enden abgeflacht waren.

Obwohl die Zellen ganz von Eis umgeben sind, werden sie nicht geschädigt. Die extrazellulären Kristalle, die fast 70 % des Gewebenvolumens einnehmen, haben bei normaler Gefriereschwindigkeit das gesamte freie Zellwasser gebunden, so daß die Zellen passiv zusammenfallen. Dieses geschieht ohne Schädigung der Zellstrukturen und der Membran; denn nach dem Auftauen sind sie wieder voll funktionsfähig (73). LOVELOCK (58) machte schon 1953 diese Beobachtungen.

Alle Befunde zeigen, daß die Zellen weder durch den Druck des umgebenden Eises zerdrückt noch von den Kristallen durchbohrt werden. Damit ist die Theorie der mechanischen Kompression und Zellruptur endgültig widerlegt.

c) Elektrolytkonzentration

Beim Gefrieren von Zellen und Geweben entstehen zahlreiche Eiskristalle, die mit fallender Temperatur größer werden und den Elektrolytlösungen des biologischen Systems in zunehmendem Maße Wasser entziehen. Dadurch steigt die Salzkonzentration schnell an. Bei -1°C ist sie doppelt so hoch wie bei normaler Temperatur, und bei -3°C hat sie das Sechsfache des Ausgangswertes erreicht (46). Bei -5°C ist die physiologische Kochsalzlösung 9 %ig, und damit ist die Grenze für das Überleben jeder Säugetierzelle, die auf diese Temperatur gefroren wird, erreicht (50).

Bei Versuchen mit roten Blutkörperchen fand LOVELOCK (56), daß Erythrocyten schnelles Gefrieren und Auftauen überstehen. Daraus schloß er, daß die Eisbildung selbst nicht schädlich sein müsse. Wenn die roten Blutzellen auf -4°C gefroren werden, überleben sie, obwohl 90 % des Wassers auskristallisiert ist. Der kritische Temperaturbereich, in dem die Zellen irreversibel geschädigt werden, wenn sie sich länger als einige Sekunden darin befinden, liegt zwischen -4°C und -40°C . Bei schnellem Durchqueren dieses Bereiches tritt die schädigende Wirkung der Salze wegen der relativ langsamen Reaktion des Natriumchlorids nicht ein. Die obere Grenze des kritischen Temperaturbereiches ist durch den Gefrierpunkt der 0,8 M NaCl-Lösung bestimmt, die untere durch die eutektische Temperatur des Salz- und Substratgemisches in den Erythrocyten. Steigt die Salzkonzentration auf Werte über 0,8 M an, so tritt Hämolyse ein.

LOVELOCK beobachtete mehrere Wirkungen der erhöhten Elektrolytkonzentration auf die roten Blutkörperchen. Die Erythrocyten werden in Kochsalzlösungen, die stärker als 0,8 M sind, für Na-Ionen permeabel, so daß die inne-

re Na^+ -Konzentration steigt. Beim Eintauchen in physiologische Natriumchloridlösung hämolysieren sie. Weiterhin entwickeln sie eine starke Empfindlichkeit gegenüber Kälte- und mechanischem Schock. Werden sie bei hohen Salzkonzentrationen schnell von -10°C auf -50°C gekühlt, so tritt Hämolyse ein. Diese wird auch durch Zentrifugieren bewirkt. Steigt die NaCl -Konzentration auf 3,0 M und darüber an - das geschieht erst bei Temperaturen unter -10°C -, so werden die Zellen durch die lyotropen Wirkungen der Salzlösung vollständig zerstört. Durch die Elektrolytveränderungen wird besonders die chemische und physikalische Struktur der Zellmembran, die reich an Lipoiden und Lipoproteinen ist, beeinflusst. Die wichtigsten Lipide sind das Cholesterin und die Phospholipide. Der selektive Verlust dieser Substanzen bei hoher Salzkonzentration macht die Blutzellenmembran für Kationen durchlässig. So ist die Zellmembran der Sitz des Zellschadens (56).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von WEISS und ARMSTRONG (122) an gefrorenen und aufgetauten Säugerzellen zeigten starke Veränderungen der Kernmembranen, die wie alle Membranen einen hohen Gehalt an Lipoproteinen haben. Die zwei Schichten der Kernwand waren voneinander getrennt, und zwischen ihnen hatten sich perinukleäre Blasen gebildet. Nach LOVELOCK können diese Vakuolen kein Gefrierprodukt sein, da das Material vor der Fixierung aufgetaut wurde. So scheidet die Eiskristallbildung als Ursache der Zellschäden aus. Es bleibt die erhöhte Salzkonzentration als schädigender Faktor.

Der Anstieg der Elektrolytkonzentration führt nicht nur zu einer Veränderung der Lipide, sondern bewirkt auch die Denaturierung der Zellproteine und die Änderung der Kolloidstruktur. PARTMANN (81) sieht in der Gefrierdenaturierung vorwiegend einen Aggregationseffekt, der auf dem Auftreten von Unterschieden im Wasserdampfdruck innerhalb des Systems beruht. Die Erhöhung der Salzkonzentration in der Restlösung begünstigt diesen Prozeß. Die Gefriereschwindigkeit hat im Vergleich zur Lagertemperatur und -zeit nur geringen Einfluß auf die Denaturierung, die innerhalb des Gefrierbereiches mit steigender Temperatur und steigender Lagerdauer zunimmt. Der Temperaturbereich zwischen -2°C und -8°C ist besonders kritisch, weil in diesem der Hauptanteil des Zellwassers ausfriert.

Da die Enzyme Eiweißkörper sind oder an solche gebunden, unterliegen auch sie den Denaturierungsvorgängen während des Gefrierens. So kommt es zu einer Änderung oder sogar zu einer Disharmonie der Enzymaktivität (50), auf die schon in einem vorhergehenden Kapitel hingewiesen worden ist.

Die Theorie, die LOVELOCK (56) 1953 auf Grund seiner Beobachtungen an Erythrocyten aufstellte, nennt die Erhöhung der Elektrolytkonzentration in den Zellen und Geweben als primäre Ursache für Gefrierschäden und Zelltod. Die Eisbildung führt durch den Wasserentzug zum Anstieg der Salzkonzentration.

Die Eiskristalle selbst werden als unschädliche und träge Fremdkörper in der Gewebematrix angesehen. Durch den lyotropen Effekt der stark konzentrierten Salze kommt es zu Strukturveränderungen an den Zellmembranen, die sich in Permeabilitätsstörungen äußern. Die Erhöhung der Elektrolytkonzentration bewirkt weiterhin eine Proteindenaturierung und eine Veränderung des kolloidalen Systems. Daraus resultieren strukturelle und funktionelle Störungen, die zum Zelltod führen können.

Die LOVELOCK'sche Hypothese wird durch mikroskopische Untersuchungen erhärtet, ebenso durch den Schutzmechanismus des Glycerins. Da an anderer Stelle dieses Gefrierschutzmittel ausführlicher besprochen wird, sei nur auf seine Puffereigenschaften hingewiesen. Glycerin bindet über seine Hydroxylgruppen Wassermoleküle, so daß diese nicht auskristallisieren können. Dadurch verhindert es die starke Erhöhung der Salzkonzentration und deren schädigende Wirkung auf die Zellen.

Es hat sich herausgestellt, daß nicht alle beobachteten Phänomene und nicht alle Untersuchungsergebnisse mit dieser Theorie in Einklang gebracht werden können. So kann die "Zwei-Stufen-Kühlung" nicht mit der LOVELOCK'schen Hypothese erklärt werden. LUYET und KEANE (66) berichteten, daß 75 % der Bullenspermien überlebten, wenn sie schnell auf Temperaturen zwischen -27°C und -30°C gekühlt und nach 5 Minuten in flüssigen Stickstoff von -196°C getaucht wurden. Kein Samenfaden überlebte, wenn das Sperma in der ersten Kühlphase nur auf -20°C gefroren wurde. Auch TAYLOR (115) fand bei Versuchen mit menschlichen Corneazellen und Hautzellen von Hühnerembryos, die auf -78°C oder -120°C gefroren wurden, die höchste Überlebensrate, wenn der Kühlvorgang auf Temperaturen über -20°C für eine bestimmte Zeit unterbrochen wurde. Diese Zeit ist von der Haltetemperatur abhängig und beträgt ca. 30 sec. Bei den Ciliaten *tetrahymena pyriformis*, die von SHUHWEI HWANG und M. (101) untersucht wurden, zeigte sich nach der Zwei-Stufen-Kühlung in 10 % DMSO-Lösung eine höhere Überlebensrate als nach einmaligem schnellem Gefrieren auf -196°C . Dabei war der Beweglichkeitsverlust - die Beweglichkeit war das Kriterium der Lebensfähigkeit - in der ersten Phase größer als bei der nachfolgenden Temperatursenkung von -20°C auf -196°C . Schnelles und ultraschnelles Gefrieren tötete alle Ciliaten ab.

Nachdem die Schutzwirkung des Glycerins gegen Gefrierschäden erkannt wurde, sind schon viele andere Gefrierschutzmittel gefunden worden, deren Schutzmechanismus aber nicht wie beim Glycerin auf der Puffereigenschaft beruht. So können Polyvinylpyrrolidon, Polyäthylenglycol und andere Makromoleküle (107) nicht in die Zellen eindringen und dennoch den Geweben Schutz geben. Andere Schutzmittel, die nicht als Puffer wirken, sind Xylose, Chloroform und verschiedene Aminosäuren.

In starkem Widerspruch zur Elektrolytkonzentrationstheorie steht die Tatsache, daß die Sporen des *Aspergillus flavus* zu mehr als 80 % die Einwirkungen einer 4,0 M Calciumchloridlösung und einer 3,3 M Magnesiumchloridlösung bei Temperaturen von -45°C und -26°C überleben, erst recht in nicht gefrorenem Zustand. In destilliertem Wasser bleiben bei Kühlung auf dieselben Temperaturen weniger als 20 % der Sporen lebensfähig. MAZUR (70) fand weiterhin, daß die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und die *Aspergillus*sporen zu 60 % und mehr den Gefrierprozeß auf -15°C überstehen.

Diese Versuche zeigen, daß die Erhöhung der Salzkonzentration - wenn überhaupt - nicht die ausschließliche Ursache der Zellschädigung und des Zelltodes ist.

d) Eiskristallisation

Viele Autoren sehen die intrazelluläre Eisbildung als den schädigenden Vorgang beim Gefrieren an. Die Annahme, daß extrazelluläre Eiskristalle auf mechanischem Wege den Zelltod verursachen, ist durch zahlreiche Untersuchungen widerlegt worden. Die Bedeutung des extrazellulären Eises besteht darin, daß es die intrazelluläre Kristallisation induziert (106).

SMITH, POLGE und SMILES (109) untersuchten 1951 die intrazelluläre Eisbildung an Amöben. Nachdem das Medium schon bei -5°C gefror, trat die Kristallisation in den Zellen erst bei -8°C ein. Das Innere der Amöben erschien im Mikroskop schwarz ("blacking out"), da das Licht von den zahllosen Kristallen diffus zerstreut wurde. Nach dem Auftauen waren die Zellmembranen gewöhnlich rupturiert.

Nicht alle Zellen erscheinen nach intrazellulärer Eisbildung und anschließendem Erwärmen, obwohl sie durch den Gefrierprozeß getötet worden sind, morphologisch verändert. Doch haben elektronenmikroskopische Untersuchungen von RAPATZ und LUYET (87) und MAZUR (71) Veränderungen der Zellstruktur und Ruptur der Membran durch intrazelluläre Kristalle nachgewiesen.

Versuche von SMITH und SMILES (110) mit vielkernigen Spermatiden zeigten ebenfalls die tödliche Wirkung des intrazellulären Eises. Nach dem Gefrieren auf -80°C in 15 %iger Glycerinlösung und nachfolgendem Auftauen waren die Zellen unverändert und beweglich, da Glycerin die Eisbildung des Zellwassers und damit den Zelltod verhinderte. Wurden die Spermatiden ohne Glycerin gekühlt, trat zwischen -5°C und -20°C die innere Kristallisation ein, und die Zellen starben ab.

RAPATZ und LUYET (87) untersuchten die Beziehung zwischen intrazellulärer Eisbildung und Hämolyse am Rinderblut und fanden, daß mit dem Ansteigen der Kühlrate das Ausmaß der Hämolyse zunimmt. Bei hoher Gefriergeschwindigkeit kommt es zur Kristallisation des Zellwassers mit nachfolgender Zellschä-

digung. Tritt durch langsame Temperatursenkung nur eine extrazelluläre Eisbildung ein, hämolysieren wenige Zellen.

All diese Versuchsergebnisse, wie auch den Vorgang der Zwei-Phasen-Kühlung und die Wirkung der Gefrierschutzmittel hat MAZUR (70) zu erklären versucht. Seine Theorie stützt sich auf folgende Tatsachen. 1. Hefen, die einer zunehmenden Salzkonzentration im umgebenden Medium ausgesetzt sind, werden geschädigt bzw. getötet. 2. Da der Zelltod im ungefrorenen Medium nicht eintritt, ist das Auftreten von Eiskristallen eine Voraussetzung für die Zellschädigung. 3. Die Überlebensrate der Zellen ist bis zu einer bestimmten kritischen Temperaturzone unterhalb des Nullpunktes ziemlich hoch und fällt dann bei schnellem Kühlen plötzlich stark ab, während sie bei niedriger Kühlrate weniger abnimmt. 4. In langsam gekühlten Zellsuspensionen liegen die Eiskristalle nur extrazellulär, während sich bei schnellem Gefrieren extra- und intrazellulär Eiskristalle gebildet haben.

Aus diesen Tatsachen stellt MAZUR folgende Hypothese auf. Wird eine Zellsuspension in wässriger Lösung unter 0°C gekühlt, wird zuerst das extra- und das intrazelluläre Wasser unterkühlt. Bei einer bestimmten Temperatur, die von der Art und Zusammensetzung des Systems abhängig ist, beginnt die extrazelluläre Eiskristallbildung. Diese Temperatur liegt zwischen -10°C und -15°C . Das intrazelluläre Wasser neigt stark zur Unterkühlung, weil das Vorhandensein eines Kristallisationskeimes in dem winzigen Wasservolumen der Zellen unwahrscheinlich ist. Mit sinkender Temperatur nimmt die Größe der Eiskristalle von fast unendlich bei 0°C bis zu anorganisch molekularen Einheiten bei -100°C ab. Es wird allgemein angenommen, daß die Zellmembranen von vielen mit Wasser gefüllten Kanälchen durchsetzt sind, deren Durchmesser in Ångström-Einheiten gemessen werden. Wenn das äußere Wasser bei relativ hohen Temperaturen von -10°C gefriert, sind die Eiskristalle noch zu groß, um durch die Membrankanäle in die Zellen einzudringen und das unterkühlte Wasser zu beimpfen. Fällt die Temperatur, so nimmt die Kristallgröße ab, bis sie bei -15°C den kritischen Durchmesser von 25 Å erreicht. Unterhalb -15°C können die Eiskristalle die Kanälchen durchwandern und die intrazelluläre Kristallisation in Gang setzen. Über -15°C bildet die Zellmembran für die Eiskristalle eine Schranke, unter -15°C nicht mehr.

Wenn das Wasser im äußeren Medium gefriert, sinkt sein Dampfdruck sofort unter den des unterkühlten Zellwassers. Um diesen Druckunterschied auszugleichen, wandern die Wassermoleküle aus den Zellen heraus. Während des langsamen Kühlens ist genügend Zeit vorhanden, den Zellen eine beträchtliche Wassermenge zu entziehen, bevor die intrazelluläre Kristallisation beginnt. Ist nun die Temperatur, bei der die Eisbildung in den Zellen einsetzen kann, erreicht, sind die Zellen zu sehr dehydriert, um überhaupt noch bei irgendeiner Tempe-

ratur zu gefrieren. Bei schnellem Kühlen aber reicht die Zeit nicht aus, genügend intrazelluläres Wasser zu entfernen, um das Gefrieren der Zellflüssigkeit zu verhindern. Das Zellwasser kristallisiert aus, und die Zellen werden geschädigt bzw. getötet.

Mit dieser Theorie ist auch die Zwei-Stufen-Kühlung erklärt. Während der langsamen Phase werden die Zellen durch das extrazelluläre Eis so weit dehydriert, daß die während der schnellen Temperatursenkung entstehenden intrazellulären Kristalle zu klein sind, um die Zellen zu schädigen. Die Wirkung der Schutzmittel besteht darin, daß sie das Eindringen der äußeren Kristalle durch die Membrankanäle in das Zellinnere verhindern.

Die Ansicht, der Zellschaden, verursacht durch die intrazelluläre Eisbildung, bestehe in einer Kompression der Zellbestandteile durch die Kristalle, teilt MAZUR nicht. Er fand bei Versuchen mit *Saccaromyces cerevisiae* (71), daß nach schnellem Gefrieren auf -30°C das Volumen der Zellen nur noch 50 % betrug und die zentralen Vakuolen zerstört waren. Die Zerstörung der Vakuolenmembran und die Schädigung der Zellwand und ihrer Permeabilität erlaubten den Ausstrom von Zellflüssigkeit, die 11 - 16 % gelöste Stoffe mit einem Molekulargewicht unter 600 enthielt. Dadurch stieg das spezifische Gewicht der Zellen an. Die ausgetretenen Substanzen waren Zucker, Fettsäuren, Ester und besondere Aminoverbindungen.

MAZUR sieht also die schädigende Wirkung der intrazellulären Kristalle in der mechanischen Zerstörung der Zellmembranen. Seine elektronenmikroskopischen Befunde wurden von RAPATZ und LUYET (87) bestätigt. Diese fanden in ihren Präparaten Zellrupturen und Eiskristallbrücken zwischen intra- und extrazellulärem Eis.

e) Rekristallisation

MAZUR sieht in der intrazellulären Eisbildung die Ursache des Zelltodes. Doch das Phänomen der Rekristallisation zeigt, daß nicht nur das Vorhandensein von Kristallen entscheidend ist, sondern auch die Größe der Eiskristalle. Bei ultraschnellem Kühlen entstehen kleinste intrazelluläre Kristalle, die, wenn sie ultraschnell aufgetaut werden, keine schädigende Wirkung zeigen. Ist aber die Auftaurate niedrig, wachsen die Mikrokristalle durch die Rekristallisation an und zerstören die Zelle (70). So erniedrigt bei *Pasteurella tularensis* der Wechsel vom langsamen zum schnellen Erwärmen die Mortalität von 99,9 % auf weniger als 50 % (71).

LUYET (65) versteht unter Rekristallisation einen Kristallisationsprozeß, der sich während der Erwärmung gefrorener Lösungen in dem Temperaturbereich von -120°C bis 0°C vollzieht und bei dem ein Wachstum von Kristallen stattfindet. Er unterscheidet zwischen "irruptive" und "migratory recrystallisation".

Taut man ein schnell gefrorenes Präparat, das durchsichtig geblieben ist, schnell auf, so wird es plötzlich opak (irruptive recrystallisation). Wird dagegen ein Präparat so langsam gefroren, daß die Kristalle im mikroskopischen Bereich liegen, und dann erwärmt, so wachsen die größeren Kristalle auf Kosten der kleinen. Diese verschwinden durch das Abwandern der Wassermoleküle vollständig (migratory recrystallisation). Die "migratory recrystallisation" vollzieht sich in demselben Temperaturbereich, in dem auch die "irruptive recrystallisation" stattfindet. Unterhalb dieser Temperaturen sind gefrorene Lösungen lange Zeit stabil.

SMITH und SMILES (110) haben den Vorgang der Rekristallisation unter dem Mikroskop beobachtet. Das "blacking out" der Zellen beim ultraschnellen Kühlen verschwindet während des langsamen Auftauens, da die großen Kristalle für das Licht durchgängig sind. Die zahllosen Mikrokristalle dagegen reflektieren es diffus und lassen die Zellen schwarz erscheinen.

Da die Gefahr der Rekristallisation und der Zellschädigung während des langsamen Erwärmens besteht, werden die Zellen und Gewebe schnell aufgetaut. Der Kälteschock tritt beim Auftauen nicht ein.

4. DISKUSSION

In den vorhergehenden Kapiteln wurde eine Übersicht der Vorgänge in der Zelle während der Hypothermie, der Zellschäden und ihrer Ursachen gegeben. Es ist schwierig, die vielfältigen, sich zum Teil widersprechenden Tatsachen und die widerstreitenden Meinungen zu koordinieren. Der Grund für diese Divergenz mag einmal in dem Objekt selbst liegen, in seiner Vielgestaltigkeit und seiner Kompliziertheit, zum anderen in der Unzulänglichkeit der Untersuchungsmethoden und -mittel.

Neben der temperaturbedingten Reduktion der physikalischen und chemischen Vorgänge ist der Phasenwechsel die bedeutendste Veränderung während der Temperaturerniedrigung. Die Eisbildung kann extra- und intrazellulär eintreten, heterogen und homogen. Entscheidend für die Art der Kristallisation ist die Kühlrate. Heterogene Eisbildung bedeutet langsame Kühlung, große, extrazelluläre Kristalle, Zelltod durch Dehydrierung und erhöhte Salzkonzentration. Diese vereinfachte Definition jedoch ist nicht mehr aufrechtzuerhalten (35, 106), nachdem bei niedriger Kühlrate auch intrazelluläres Eis gefunden wurde. Damit kommt auch dieses als Ursache des Zelltodes in Frage.

Bei homogener Kristallisation, die durch schnelles Gefrieren bewirkt wird, treten kleine extra- und intrazelluläre Eiskristalle auf. Dieser Vorgang und seine schädigende Wirkung kann mit Hilfe der MAZUR'schen Theorie (70) erklärt werden, die in der intrazellulären Eisbildung die einzige Ursache des Zelltodes

sieht. Mit dieser Hypothese ist auch die Auffassung, die homogene Kristallisation sei weniger schädigend als die heterogene, widerlegt.

Eine dritte Form des Phasenwechsels ist die Vitrifikation, die Umformung des Wassers in eine amorphe, glasige Substanz. LUYET (63, 64) sah darin eine Methode, den Zelltod zu vermeiden. Seiner Meinung nach besteht die Ursache des Zellschadens in dem Wechsel der zufälligen Verteilung der Moleküle zur festen Anordnung und damit in der Zerstörung der feinen protoplasmatischen Struktur. Er erkannte jedoch später, daß eine echte Vitrifikation nur in hoch destilliertem Wasser möglich ist und das in den Zellen, obwohl die Präparate durchsichtig bleiben, immer eine Kristallbildung stattfindet (65). Diese Kristalle sind zwar nur mit dem Elektronenmikroskop zu sehen, können aber bei langsamem Erwärmen wachsen und Zellstrukturen zerstören.

Kühlrate und -temperatur bestimmen also Art und Ausmaß sämtlicher Veränderungen im Gewebe. Bei gleichmäßig sich ändernder Temperatur müßten die Zellen einem konstanten Wechsel unterworfen sein. RINFRET (89) untersuchte an Erythrocyten, ob der Gefrier-Auftauprozeß einheitlich ist. Er fand, daß die Zellen innerhalb des Systems einer Reihe verschiedener thermischer Entwicklungen unterliegen. Diese sind durch die Heterogenität der Bedingungen, die beim Phasenwechsel entstehen, bedingt. Dazu gehören verschieden hohe Salzkonzentrationen in den einzelnen Mikroregionen der gefrierenden Blutmasse, örtliche Unterschiede im pH-Wert, entstanden durch Kristallisation oder durch Präcipitation der Puffersalze und Ungleichheiten im Druck innerhalb des Präparates. So kommt es natürlich zu unterschiedlichen und auch größeren Belastungen der Zellen. Die relativ geringen thermischen Ungleichheiten im System beeinflussen die Zellen günstig oder nachteilig. Diese Untersuchungen zeigen, daß der äußere Vorgang der Temperaturniedrigung keine einheitlichen Verhältnisse im Gewebe schafft und daß die Zellen - wenn auch gering - differierenden thermischen Bedingungen unterworfen sind.

RINFRET (89) stimmt mit LOVELOCK (56) darin überein, die Ursache des Zellschadens in der Erhöhung der Elektrolytkonzentration zu sehen. LOVELOCK nimmt an, daß die durch die Eisbildung stark konzentrierten Salze die Zellmembran und ihre Lipide zerstören und die kolloidale Zellstruktur durch Eiweißdenaturierung verändern. Mit dieser Theorie können jedoch nicht alle Phänomene erklärt werden. So stellte MAZUR (70) eine Hypothese auf, nach der die Schädigung der Zellen rein mechanisch durch die intrazellulären Eiskristalle bewirkt wird. Er fand eine Erklärung für die verschiedenen Arten der Kristallisation und ihre Ursachen, für die Zwei-Phasen-Kühlung, für die "migratory recrystallisation" und für den Kälteschock. Die tödliche Wirkung des Kälteschocks besteht danach in der intrazellulären Kristallisation. Während des schnellen Kühlens bleiben die äußeren Eiskristalle so klein, daß sie das unterkühlte Zellwasser be-

impfen können. Die sich bildenden intrazellulären Kristalle sind so zahlreich, daß sie die Zelle töten.

Vergleicht man die Elektrolytkonzentrationstheorie und die Kristallisationstheorie miteinander, so zeigt sich, daß die Zellschädigung von zwei verschiedenen Standpunkten aus gesehen wird. Bei LOVELOCK steht der chemisch-dynamische Prozeß im Vordergrund, während MAZUR den physikalisch-mechanischen Vorgang betont. Beide brauchen sich nicht auszuschließen, sondern können sich ergänzen. Nach KUBANYI (50) spielt der Zeitfaktor eine große Rolle. Er nimmt an, daß die Wirkung der erhöhten Elektrolytkonzentration früher einsetzt als die der Eiskristalle.

KAROW und WEBB (46) geben der MAZUR'schen Hypothese den Vorrang, da die Elektrolytkonzentrationstheorie nicht alle Versuchsergebnisse erklären kann und die Kristallisationstheorie sowohl auf Pflanzen als auch auf tierische Zellen angewendet werden kann. Zweifellos wird auch diese, wenn die Kenntnisse über die hypothermischen Prozesse im biologischen Material umfassender sind, geändert werden müssen.

IV. MÖGLICHKEITEN DER VERHINDERUNG VON GEFRIERSCHÄDEN

Die Temperatursenkung, erfolgt sie nun schnell oder langsam, schädigt durch Eiskristallbildung und erhöhte Salzkonzentration die Zellen mehr oder weniger stark. Nur wenige Gewebe überleben langsames Gefrieren, aber auch schnelles Kühlen bewirkt die irreversible Schädigung vieler Zellgruppen. Um Möglichkeiten des Gefrierschutzes für tierisches und menschliches Gewebe zu finden, hat man winterharte Pflanzen und frostresistente Insekten und deren Schutzmechanismen untersucht.

1. SCHUTZMECHANISMUS BEI WINTERHARTEN PFLANZEN, KÄLTEUNEMPFINDLICHEN INSEKTEN UND ANDEREN ORGANISMEN

Viele Pflanzen und Tiere sind zeitweise tiefen Temperaturen unterworfen und gezwungen, sich dagegen zu schützen. Man hat nun untersucht, mit welchen Mitteln sie frost- und kälteresistent werden. Winterharte Pflanzen erhöhen im Herbst ihren Zuckergehalt durch Abbau von Stärke und verändern die physikalischen Eigenschaften ihres Protoplasmas. Die Permeabilität für polare Substanzen steigt an, das Protoplasma wird durch Dehydrierung weicher, und die Fähigkeit, eine plötzliche Deplasmolyse zu überstehen, nimmt zu. Die Chloroplasten können, wenn sie frostresistent werden, mehr Wasser binden (53).

Außer bei winterharten Pflanzen findet man einen hohen Wasserverlust bei

einigen Insekten, in Heuschrecken- und Insekteneiern, in Sporen und Samen. Organismen, die bei normalen Temperaturen ein vollständiges Austrocknen überstehen, überleben auch extreme Kälte bis zum absoluten Nullpunkt, wenn sie sich in einem reversiblen Zustand der Dehydratation befinden. Die Eiweißkomponenten des protoplasmatischen Systems müssen noch fähig sein, Wasser zu binden (105).

Es ist weiterhin bekannt, daß frostresistente Insekten in ihrem Blut und ihren Gewebsflüssigkeiten Glycerin in Konzentrationen bis 40 % haben (107).

Die Erhöhung des Zuckergehaltes und der Glycerinkonzentration und die Dehydratation der Gewebe sind die wichtigsten Schutzmechanismen bei der Entwicklung von Kälte- und Frostresistenz. Sie scheinen auch auf Gewebe homoiothermer Tiere und des Menschen anwendbar zu sein.

2. GEFRIERSCHUTZMITTEL

a) Glycerin

Bevor die Schutzwirkung von Glycerin bekannt war, wurden Zuckerlösungen zum Schutz gegen Gefrierschäden verwandt. Doch waren die Versuche wenig erfolgreich. Die Wendung in der Kältekonserverung trat 1949 mit der zufälligen Entdeckung des Glycerins als Gefrierschutzmittel durch POLGE, SMITH und PARKES (85) ein. Eigentlich war es eine Wiederentdeckung; denn ROSTAND (93) hatte schon 1946 die schützende Wirkung des Glycerins bei der Tiefkühlkonserverung von Bullensperma bei -79°C erkannt.

Bei den Versuchen von POLGE und M. (85) mit menschlichen Spermien erhöhte sich die Überlebensrate nach Zugabe von 10 % Glycerin beträchtlich. Wurde die Glycerinkonzentration erhöht, so waren die Samenfäden nach dem Auftauen unbeweglich. Eine geringere Konzentration erniedrigte die Zahl der lebensfähigen Spermien. Gute Erfolge zeigten sich bei Geflügelsamen, der verdünnt mit gleichen Teilen Ringerlösung, die 40 % Glycerin enthielt, nach dem Gefrieren und Auftauen unverändert war. Die Spermien hatten ihre volle Beweglichkeit. Gegenüber Kaninchenspermien allerdings erwies sich Glycerin als toxisch.

Glycerin ist ein dreiwertiger, niedermolekularer Alkohol, der in jedem Verhältnis in Wasser und Äthylalkohol löslich ist und sich mit Öl und Lipiden mischt. Glycerin selbst löst Elektrolyte und andere anorganische und organische Substanzen. Da es ein gutes Diffusionsvermögen hat, verdünnt es die intrazellulären hypertonen Lösungen. Der Gefrierpunkt des reinen Glycerins liegt bei 18°C , wird aber schon durch kleine Mengen Wasser stark erniedrigt. Dadurch wird die Kristallisationsgeschwindigkeit herabgesetzt. Andererseits senkt Glycerin

den Gefrierpunkt wässriger Lösungen und verzögert die Kristallisation dieser Lösungen. Durch seine Wirkung auf die extra- und intrazelluläre Eisbildung erhält es die Lebensfähigkeit der Zelle. Das Wachstum der Kristalle wird eingeschränkt. Auf Grund der wasserbindenden Eigenschaften steigt beim Gefrieren die Salzkonzentration nicht stark an und damit auch ihre schädigende Wirkung nicht. Die letzte Ursache der Schutzfunktion des Glycerins liegt also in seiner Puffereigenschaft (105, 106).

JAKOB und M. (42) konnten die Schutzwirkung des Glycerins an menschlichen Konjunktivazellen nachweisen. Diese blieben lebensfähig, wenn sie, gesättigt mit 6 %iger Glycerinlösung, bis $-272,2^{\circ}\text{C}$ gefroren und dann in einem Wasserbad von 26°C aufgetaut wurden. Ihre Versuche mit menschlichen Spermien ergaben eine Überlebensrate von 60 % unter Glycerinschutz nach Gefrieren auf Temperaturen nahe dem Nullpunkt. Ohne Glycerin blieben nur 10 % der Samenfäden beweglich.

Obwohl Glycerin selbst in hohen Dosen nicht toxisch ist (105) und diese Tatsache in vielen Versuchen bewiesen wurde, fanden EGDAHL und HARRIS (27) nach normothermer Perfusion von Hundenieren mit Glycerin schwere tubuläre Degenerationen. Mit steigender Glycerinkonzentration nahmen die Nierenschäden zu. SLOVITER (104) zeigte, daß i. v. Injektion von großen Mengen Glycerin bei Menschen und Tieren keine Schädigungen bewirkte. Dieser Befund wurde von EGDAHL und HARRIS (27) bestätigt. Nur die direkte Injektion von Glycerin in die Nierenarterie führte zu der schweren Degeneration der Tubuli. Auch SCHMIDT-MENDE (98) fand eine direkt toxische Wirkung des Glycerins auf die Niere. Dagegen erhielten RIVERS und M. (91) makro- und mikroskopisch normal aussehende, aber nicht funktionsfähige Nieren, die mit 15 % Glycerin perfundiert und 5 Stunden auf -14°C gefroren waren. Sie sahen die Ursache der Nierenschädigung in den stark osmotischen Wirkungen des Glycerins. Nach anfänglichem Gewichtsverlust bis zu 12 % kam es zur Gewichtszunahme um 50 % des Normalwertes 6 Stunden nach Perfusion mit verschiedenen konzentrierten Glycerinlösungen.

Bei Versuchen mit Hundenieren, die vor dem Gefrieren mit verschiedenen konzentrierten Glycerinlösungen perfundiert wurden, fanden STICKEL und M. (113) eine gleichmäßige Temperatursenkung während des Gefriervorganges. Glycerin reduziert nämlich die Umwandlungswärme, die beim Kristallisationsvorgang frei wird, und damit die Schäden, die beim Verzug des Gefrierprozesses auftreten. Die Toxizität wurde von den Autoren nicht untersucht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Glycerin wegen seines niedrigen Molekulargewichtes, seiner hohen Löslichkeit in wässrigen Salzlösungen, seiner Fähigkeit, in lebende Zellen einzudringen, und seiner geringen Toxizität ein ausgezeichnetes und viel verwendetes Gefrierschutzmittel ist.

b) Dimethylsulfoxyd

Nicht alle Zellen werden durch Glycerin vor den Gefrierschäden geschützt, z. B. Rindererythrocyten. Diese sind für Glycerin undurchlässig, nicht aber für Dimethylsulfoxyd (DMSO). Dieses Gefrierschutzmittel wurde 1958 von LOVELOCK und BISHOP (61) als solches erkannt. Sie fanden, daß die roten Blutkörperchen der Tiere in 15 %iger DMSO-Lösung bei Hypothermie nicht hämolysierten. Das DMSO dringt wegen der geringen Molekülgröße schnell in die Erythrocyten ein und kann auch schnell daraus entfernt werden. LOVELOCK und BISHOP (61) sahen bei ihren Versuchen, daß nach zweistündigem Einwirken von Glycerin die Rindererythrocyten weniger gegen Gefrierschäden geschützt waren als durch Dimethylsulfoxyd, dem sie nur 30 Sekunden ausgesetzt waren.

Dimethylsulfoxyd, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, wird durch Oxydation von Dimethylsulfid hergestellt. Es ist in reinem Zustand farblos und flüssig und hat einen leichten Geruch und etwas bitteren Geschmack. Sein Siedepunkt liegt bei 189°C (760 mm Hg), das spezifische Gewicht ist bei 20°C 1,100, und der Dampfdruck beträgt bei 20°C 0,37 mm Hg. Mit Wasser ist DMSO in allen Verhältnissen mischbar und löst die Gase Acetylen, Ammoniak und Schwefeldioxyd. Bei 20°C mischt es sich mit Methanol, Oktanol, Glycerin, Acetaldehyd, Aceton, Formalinsäure, Diäthyläther, Äthylacetat und Pyridin, mit vielen Proteinen und hochmolekularen Kohlenwasserstoffen. DMSO hat eine niedrige Viskosität und eine geringe Flüchtigkeit. Es greift nicht in Absorptions- und Stoffwechselvorgänge ein (15).

Eine toxische Wirkung des Dimethylsulfoxyd tritt erst in hohen Dosen ein. Die orale LD 50 für Ratten liegt nach BROWN und M. (15) bei 20 ml/kg, nach SOMMER und TAUBERGER (111) bei 17,9 ml/kg, die subkutane LD 50 bei 10,9 ml/kg und i. v. LD 50 bei 7,4 ml/kg (111). Ratten ertragen bis zu 10 Dosen von 10 ml/kg/Tag (15). Auch FARRANT (28) fand bei Mäusen nach langdauernder Einnahme von DMSO keine toxischen Erscheinungen, während durch N-Methylpyrrolidon schwere Leberschäden auftraten.

Unverdünntes oder mit Wasser verdünntes DMSO bewirkt erst in hohen Dosen nach akuter oraler oder subkutaner Verabreichung Vergiftungserscheinungen. Benommenheit, Analgesie und Atemstörungen lassen auf zentralnervöse Wirkung und Hemmung vegetativer Zentren schließen. Eine i. v. Injektion von DMSO in toxischen Dosen führt zum schnellen Tod oder zu schweren Atemstörungen, die rasch abklingen. Der Tod tritt nur dann ein, wenn der N. vagus intakt ist. Die Wirkungen sind zum großen Teil reflektorisch bedingt und als pulmonale bzw. cardiale Vagusreflexe zu deuten (111).

Die örtliche Anwendung kleiner Mengen des unverdünnten oder stark konzentrierten DMSO führt zu reversiblen Haut- und Schleimhautreizungen. Nach

intraperitonealer Injektion hoher Dosen von 5 ml/kg treten bei Ratten keine Veränderungen auf (15, 111).

Dimethylsulfoxyd wird leicht zu Dimethylsulfid reduziert. Die Versuchstiere strömten nach Verabreichung von DMSO einen intensiven, süßlichen Geruch aus. Mit Hilfe der Gaschromatographie und der Massenspektrographie wurde die dafür verantwortliche Substanz von DISTEFANO und BORGSTEDT (25) als Dimethylsulfid identifiziert. Bis dahin war die Reduktion zu DMS nur in Mikroorganismen beobachtet worden. Die Eliminierung des DMS aus dem Körper erfolgt zum großen Teil durch Abatmung mit der Expirationsluft und nur in geringem Maße durch den Darm (111).

DISTEFANO und BORGSTEDT (25) sahen nach Behandlung mit DMSO eine tiefrote Verfärbung des Urins durch Hämoglobin und Methämoglobin. Bei in vitro Versuchen mit Erythrocyten stellten SOMMER und TAUBERGER eine Braunfärbung des Hämoglobins fest. Die Identität des braunen Farbstoffs konnte von ihnen nicht geklärt werden. Auch BROWN und M. (15) fanden die Denaturierung der Blutproteine und hielten daher intravenöse Injektionen von DMSO für ungeeignet.

Im Gegensatz zu Glycerin, das Kapillaren und Arterien nicht durchdringen kann, tritt DMSO aus den Gefäßen in das umgebende Gewebe aus (107). DMSO erhöht außerdem die Permeabilität von Membranen, wie JACOB und M. (41) an der Blase bewiesen, so daß andere Stoffe in die umgebende Muskulatur gelangen können.

Um die Dimethylsulfoxydkonzentration bestimmen zu können, hat HUGGINS (38) drei analytische Techniken der quantitativen Messung ausgearbeitet. Die erste beruht auf der extremen Löslichkeit von metallischem Jod in DMSO und auf seiner relativen Unlöslichkeit in Wasser. Die zweite Methode besteht in der Markierung von DMSO mit S^{35} und Zählung der Scintillation. Das dritte analytische Verfahren ist die Gaschromatographie. Die Zeit der Heliumretention ist bei Wasser und DMSO verschieden.

Das Dimethylsulfoxyd wird als Gefrierschutzmittel viel angewendet. Seine Toxizität ist gering, es greift nicht in die Stoffwechselvorgänge der Zelle ein und hat ein großes Permeationsvermögen.

c) Andere Schutzsubstanzen

Neben den beiden Hauptgefrierschutzmitteln Glycerin und Dimethylsulfoxyd gibt es noch andere Schutzsubstanzen. Diese aber sind oft weniger wirksam und können nur für einzelne Gewebe angewendet werden.

Chloroform scheint ein wirksames Mittel gegen Gefrierschäden zu sein. CONNAUGHTON und LEWIS (22) kühlten Kaninchenherzen auf 10°C und per-

fundierten sie dann mit Chloroform-Locke-Lösung. Alle Herzen erhielten nach Erwärmen ihre Aktivität wieder, eins schlug schon bei tiefer Temperatur nach Zugabe von Chloroform. Von drei Herzen, die 30 min bei -20°C in Chloroformlösung gefroren waren, schlug eins nach Auftauen und Entfernen des Chloroforms im normalen Rhythmus. Die beiden anderen zeigten keine Aktivität.

POLGE und M. (85) entdeckten die Schutzwirkung von Propylenglykol und Äthylenglykol bei Spermien, doch besteht der Nachteil dieser Substanzen gegenüber Glycerin in ihrer höheren Toxizität.

Methyl- und Dimethylformamid, Methyl- und Dimethylacetamid gaben bei Versuchen von FARRANT (28) glatter Muskulatur einen gewissen Schutz gegen Kälteschäden. Diese Substanzen sind zwar nicht ionisiert, aber genügend polar, um über Wasserstoffbrücken Wasser zu binden. Zwei andere Substanzen, die Erythrocyten schützen, Pyridin-N-oxyd und N-Methylpyrrolidon zeigten gegenüber Muskelgewebe keine Schutzwirkung.

LOVELOCK und BISHOP (61) fanden noch andere Gefrierschutzmittel: Methanol und Glycerylmonoacetat. Die Hauptwirkung der neutralen Lösungen besteht in der Fähigkeit, die starke Konzentration von Elektrolyten und anderen Substanzen zu verhindern.

Alle bisher genannten Verbindungen schützen Erythrocyten nur in dem Temperaturbereich zwischen 0°C und -30°C — 40°C . Dagegen bieten Glukose, Laktose und Xylose den roten Blutzellen bei allen Temperaturen leichten, aber unvollständigen Schutz (106).

Eine größere Gruppe von Schutzsubstanzen, die besonders die roten Blutkörperchen und Knochenmarkszellen vor irreversiblen Schäden schützen und so ihre Konservierung ermöglichen, bilden die Makromoleküle. Dazu gehören Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyäthylenglykol und Dextran (73, 75, 90, 107). Diese hochmolekularen Stoffe können nicht in die Zellen eindringen. Sie sind an die Zellmembran adsorbiert und schützen die Lipoproteine und anderes Material gegen die schädigenden Einflüsse der ansteigenden Salzkonzentration im Medium. Sie verschließen die Poren der Zellmembran und verhindern dadurch die intrazelluläre Kristallisation. Der Gefrierschutz ist nicht immer vollkommen, da es unmöglich ist, die Makromoleküle, selbst in einer Suspension, an jede Zelle heranzubringen (107).

Die genannten Gefrierschutzmittel können nur in begrenztem Maße eine Schutzfunktion ausüben, da sie nicht alle Forderungen, die an eine Schutzsubstanz gestellt werden, erfüllen: Fehlen der Toxizität, gutes Wasserbindungsvermögen, Diffusions- und Permeationsfähigkeit.

3. GEFRIERSCHUTZ DURCH MECHANISCHE GEFRIERPUNKTSERNIEDRIGUNG

In der Dehydratation ist eine Möglichkeit gegeben, die Eiskristallbildung in den Geweben zu verhindern oder wenigstens zu verzögern und eine gewisse Kälteresistenz zu schaffen. Durch den Wasserentzug wird der Gefrierpunkt gesenkt, und zwar umso tiefer, je mehr Wasser entfernt wird. Versuche, bei denen eine Dehydratation bei normalen und subnormalen Temperaturen mit 40 - 50 % Zuckerlösung oder 30 % Äthylenglykol durchgeführt wurde, ergaben, daß die Mehrzahl der lebenden Zellen gegen Kälte nicht widerstandsfähiger wurde. Es zeigte sich, daß die Dehydrierung bei Temperaturen über 0°C für die meisten Gewebe, besonders für die der Wirbeltiere, schädlich ist. Je nach Art überstehen die Zellen einen Wasserentzug von nicht mehr als 20 - 80 % (105).

BARSAMIAN und M. (7) führten Versuche mit Hundeherzen durch und fanden, daß die auf -2°C und darunter gefrorenen Organe nicht mehr lebens- und funktionsfähig waren. Nach einer Dehydrierung bis zu 55 % und anschließender Rehydrierung mit 5 %iger Glukose-Lösung zeigten die Herzen rhythmische Aktionen. Bei totaler Dehydratation betrug die Menge des extrahierten Wassers 79,2 % des Gewichts. Wasserentzug und Sättigung mit Glycerin durch Eintauchen in 70 %ige Glycerinlösung von -8°C ermöglichten eine Temperatursenkung ohne Gefrieren. Der Gefrierpunkt war auf -9°C erniedrigt. Nach Rehydrierung, Erwärmung und Homoiotransplantation schlugen die Herzen für 8 - 12 Stunden.

Außer durch Dehydratation kann eine Gefrierpunktserniedrigung durch Anwendung von hydrostatischem Druck erreicht werden. Dieser verhindert die Eisbildung, bei der sich das Wasser ausdehnt. Mit zunehmendem Druck sinkt der Gefrierpunkt.

JACOB und WEBB (43) gelang bei Hundeherzen die Gefrierpunktserniedrigung durch Druck bis auf -20°C . Nach einer Ischämiephase von 6 Stunden wurden die Herzen aufgetaut und in den Nacken erwachsener Hunde homoiotransplantiert. Obwohl alle Organe makro- und mikroskopisch normal erschienen, zeigten sie nach Transplantation keine rhythmische Tätigkeit, noch reagierten sie auf elektrische Reize. Die Ursache hierfür mag in der gleichzeitigen Anwendung von Temperatursenkung und äußerem Druck liegen; denn isolierte Hundeherzen, die bei Zimmertemperatur hohen Drucken ausgesetzt wurden, waren nach Retransplantation zu rhythmischen Aktionen fähig.

Daß erhöhte äußere Drucke allein die Lebensfähigkeit der Gewebe nicht zerstören, wurde an Embryoherzen bewiesen, die nach Anwendung eines Druckes von 1850 Atü in der Gewebekultur weiterwuchsen (43).

Auch ROBERTSON und M. (32) befaßten sich mit der mechanischen Gefrierpunktniedrigung durch hydrostatischen Druck. Sie fanden, daß Hundeherzen einen Druck von 1406 kg/cm^2 für 15 Minuten und von 708 kg/cm^2 für 90 Minuten tolerieren. Durch einen Druck von 160 kg/cm^2 wurden zwei Herzen auf -2°C unterkühlt und erlangten nach einer Lagerzeit von 20 und 22 Stunden eine normale Aktivität für 3 und 10 Stunden.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die mechanische Gefrierpunktniedrigung durch Dehydratation und hydrostatischen Druck den Geweben und Organen einen gewissen Schutz gegen die Schäden der Hypothermie geben kann. Leider ist diese Methode nicht auf alle Organe anwendbar.

4. DISKUSSION

Da die Zellschäden beim Gefrieren durch Kristallisation des Zellwassers und dadurch bedingt erhöhte Salzkonzentration verursacht werden, muß man versuchen, diese Faktoren zu beseitigen bzw. einzuschränken. Ultraschnelles Kühlen auf tiefe Temperaturen verhindert sowohl die Bildung großer, schädlicher Kristalle als auch die irreversible Schädigung durch hohe Elektrolytkonzentrationen. Doch ist diese Methode, abgesehen von einigen speziellen Fällen (63, 64), nicht durchführbar, da die äußere Temperaturniedrigung zu schnell und die Wärmeleitung und Wärmefusion im Präparat zu langsam erfolgen. So sieht man in Analogie zu winterharten Pflanzen und frostresistenten Organismen, die sich durch Erhöhung ihres Zucker- und Glyceringehaltes und durch Dehydratation schützen, in der Anwendung von Gefrierschutzmitteln und in mechanischer Gefrierpunktniedrigung Methoden zur Verhinderung hypothermischer Schäden.

Während die mechanische Gefrierpunktniedrigung bisher nur bei einem Organ, dem Herzen, angewandt worden ist, werden die Gefrierschutzmittel häufig und für viele Gewebe gebraucht. Die Schutzwirkung dieser Substanzen besteht darin, daß sie einen wesentlichen Teil des Wassers durch chemische Bindung oder durch Assoziation zurückhalten. Dabei dürfen sie nicht toxisch sein und müssen in die Zellen eintreten (57, 59). Die Bindung der Wassermoleküle an das Schutzmittel erfolgt durch Wasserstoffbrücken. Der Sauerstoff des nicht ionisierten neutralen Substrates verbindet sich über ein einzelnes Elektronenpaar mit dem Wasserstoff des Wassers oder umgekehrt, der Wasserstoff der Substanz mit den Sauerstoffatomen der Wassermoleküle (107).

Das wichtigste Gefrierschutzmittel ist Glycerin, das auf Grund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften viele Gewebe ausreichend vor den Gefrierschäden schützt. Der größte Vorteil des Glycerins gegenüber anderen Schutzsubstanzen ist seine minimale Toxizität. Mit Ausnahme der Niere sind bisher

noch keine toxischen Erscheinungen in den Organen festgestellt worden.

Ein anderes wichtiges Gefrierschutzmittel ist Dimethylsulfoxyd, dessen Schutzwirkung der des Glycerins entspricht. Es hat ein gutes Wasserbindungsvermögen und dringt schnell, manchmal schneller als Glycerin, in die Zellen ein. ASHWOOD - SMITH (6) fand, daß die Toxizität des DMSO bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion nur halb so groß wie die des Glycerins ist. Diese Beobachtung deckt sich mit Versuchsergebnissen von PEGG (83), der die Konservierung von Knochenmark unter Verwendung von DMSO untersuchte.

Kein Gefrierschutzmittel kann mit gleichem Erfolg auf alle Gewebe angewendet werden; denn jedes Gewebe reagiert auf ein bestimmtes Substrat anders. So ist die Schutzwirkung von DMSO auf Bullenspermien nicht so groß wie die des Glycerins. Dagegen gibt DMSO den Rindererythrocyten, die durch Glycerin nicht geschützt werden, ausreichenden Schutz. Die Spezifität der einzelnen Gefrierschutzmittel zeigt sich besonders bei den weniger wirksamen Zuckern, Alkoholen, Amiden, Chloroform und bei den Makromolekülen wie PVP, Dextran und Polyäthylenglykol. Die letzteren können nicht in die Zellen eindringen, sondern bilden eine schützende Hülle um die Zellen. Sie schützen Blutzellen, Knochenmarkszellen und auch Mikroorganismen (107) und sind für die Konservierung von Blut und Plasma sehr wichtig.

Die mechanische Gefrierpunktniedrigung durch Dehydratation und hydrostatischen Druck ist bisher nur bei der Konservierung von Herzen angewandt worden. Die relativ guten Erfolge rechtfertigen diese Methode. Doch es ergeben sich dabei einige Schwierigkeiten. Nur wenige Gewebe überstehen einen Wasserentzug vor dem Kühlen. Ein zweiter Nachteil ist der, daß die Organe nur bis auf wenige Grade unter 0°C , bis auf den Gefrierpunkt, gekühlt werden können. Eine Tiefkühl- und Langzeitkonservierung scheint daher mit dieser Methode nicht möglich zu sein. Durch die zusätzliche Sättigung mit Glycerin oder anderen neutralen Lösungen kann der Gefrierpunkt jedoch noch weiter erniedrigt werden. Um eine Verlängerung der in-vitro-Konservierung von Herzen zu erreichen, werden Zusätze von metabolisierenden Substanzen wie Glukose, Laktat und Pyruvat zu Glycerinlösung und Sättigung mit physikalisch gelöstem Sauerstoff diskutiert (7).

Versuche, bei denen die Gefrierpunktniedrigung durch Erhöhung des äußeren Druckes erfolgte, zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Einige Herzen erlangten ihre rhythmische Aktivität wieder, andere nicht. JACOB und WEBB (43) sahen die Ursache des Funktionsverlustes nach Kühlen unter erhöhtem Druck in der gleichzeitigen Anwendung von Hypothermie und hydrostatischem Druck. Eine Möglichkeit, die Konservierungs- und Überlebenschancen der Organe zu verbessern, mag in der Erhöhung des äußeren Druckes vor Temperatursenkung bestehen (42).

Vergleicht man die Methoden und Mittel zur Verhinderung von Gefrierschäden, so zeigt sich, daß ein optimaler Gefrierschutz nicht erreicht werden kann. Die Verwendung von Gefrierschutzmitteln ist für die meisten Gewebe erforderlich, da sowohl das ultraschnelle Kühlen als auch die mechanische Gefrierpunktserniedrigung nur auf wenige Gewebe anwendbar sind. Die Wahl des Schutzmittels wird von Art, Größe und Herkunft des Organs bestimmt.

V. METHODEN DER KÜHLUNG, LAGERUNG UND ERWÄRMUNG

1. WÄRMELEITUNG DURCH KONTAKT

Um die Schäden eines Organs, die durch das Gefrieren an sich verursacht werden, nicht noch zu vergrößern, sind ein möglichst gleichmäßiges Kühlen und Erwärmen erforderlich. Beide Vorgänge können durch Wärmeleitung zwischen zwei sich berührenden, verschieden temperierten Körpern durchgeführt werden. Die schnelleren Moleküle des wärmeren Körpers übertragen ihre Energie auf die langsameren des kälteren Gegenstandes, bis ein Gleichgewicht eintritt. Dieser Wärmeaustausch verläuft beim Kühlen bis zum Nullpunkt ziemlich homogen. Unter 0°C ist die gleichmäßige Wärmeverteilung durch die Eisbildung, die an der Kontaktfläche des Körpers einsetzt, erschwert, wenn nicht unmöglich. Da die Wärmeleitfähigkeit des Eises zehnmal größer als die des Wassers ist, sinkt die Temperatur an der Oberfläche schnell unter 0°C ab, während sie im Inneren über dem Nullpunkt bleibt. Dieser Temperaturunterschied innerhalb des Organs gleicht sich bei weiterer Wärmezufuhr aus.

Beim Erwärmen ist der Vorgang umgekehrt. Die Temperatur der Oberfläche steigt stark an, und das Eis schmilzt. Wegen der schlechten Wärmeleitfähigkeit des Wassers wirkt die aufgetaute Schicht als Isolator und verzögert das Auftauen im Inneren des Organs. So ist der Temperaturunterschied beim Erwärmen wesentlich größer als beim Kühlen und bleibt auch länger erhalten. Das Organ befindet sich relativ lange in dem kritischen Temperaturbereich zwischen -3°C und -40°C , in dem eine Rekrystallisation eintreten kann.

Da Temperaturunterschiede innerhalb eines Organs Unterschiede in der Stoffwechselaktivität bedingen, müssen sie durch schnelles Kühlen und schnelles Erwärmen vermieden werden. Rasches Gefrieren kann leicht durch Eintauchen des Organs in tief temperierte Flüssigkeit wie flüssiges Helium oder flüssigen Stickstoff erreicht werden. Dagegen erfolgt die Erwärmung in einem heißen Bad nicht sehr schnell; denn die Temperatur der Flüssigkeit darf 40°C nicht überschreiten.

Die Methode der Wärmezufuhr durch Oberflächenkontakt kann nur auf Zellsuspensionen, Gewebeschnitte und kleine Organe erfolgreich angewendet werden. Bei größeren Organen und dichteren Geweben ist eine gleichmäßige Wärmeverteilung während des Kühlens und Erwärmens nicht möglich.

2. WÄRMESTRAHLUNG

Auf die Methode der Wärmestrahlung soll kurz eingegangen werden. Die Anwendung von Strahlen des sichtbaren und Infrarotbereiches bewirkt nur eine oberflächliche Erwärmung der subkutanen Gewebe und Muskeln.

Wegen ihrer geringen Tiefenwirkung ist die Anwendung der Infrarotstrahlen beim Gefriertrocknen sehr vorteilhaft. Die Strahlen erwärmen die äußere Schicht des gefrorenen Körpers, so daß es zur Sublimation kommt, erhöhen jedoch die Temperatur im gefrorenen Inneren nicht.

Sonst wird die Infrarotstrahlung nur noch selten angewendet, da wirkungsvollere Erwärmungsmethoden entwickelt wurden.

3. DIATHERMIE

Eine Methode, die die schnelle und gleichmäßige Erwärmung von Geweben und Organen ermöglicht, ist die Diathermie. Die Mikrowellen-Diathermie wurde zum ersten Mal 1955 von ANDJUS und LOVELOCK (2) zur schnellen lokalen Erwärmung von in situ Rattenherzen angewandt. Durch die Tiefenwirkung wurden oberflächliches Erwärmen und Hautverbrennungen vermieden. Später gelang es mit Hilfe der 27 Megahertz-Kurzwellen-Diathermie, gefrorene Hamster in 3 Minuten vollständig aufzutauen. Diese Tiere, die 50 Minuten gefroren waren, konnten wieder aufgeweckt werden und zeigten ein normales Verhalten (106).

Die Anwendung der Diathermie auf die Niere untersuchten LEHR und M. (52). Die 3 Kilomegahertz-Mikrowellen (Radar) bewirken in einem Organ von der Größe der Niere eine ungleichmäßige Wärmedurchdringung. Während die Außenbezirke stark überhitzt werden, bleibt das Innere gefroren. Damit scheidet diese Methode für die Erwärmung der Niere aus.

Die Kurzwellendiathermie dagegen führt zu gleichmäßiger Erwärmung des Organs. Mit zylindrischer Elektrodenanordnung beträgt die maximale Wärmerate $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Beim Eintauchen einer Hundeniere in eine Salzlösung wird eine Auftau rate von nur $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erreicht.

Eine deutliche Verkürzung der Erwärmungszeit durch die Kurzwellendiathermie wiesen SILVER und M. (102) an Gewebezellkulturen nach. Während die Zellkulturen durch die Anwendung von 27 Megahertz-Diathermie bei 240°C

280 mA in 15 - 20 sec von -190°C aufgetaut wurden, benötigten sie durch Eintauchen in ein Wasserbad von 37°C 60 - 80 sec.

Die Kurzwellendiathermie erfordert eine gute technische Überwachung. Schon geringes Überhitzen beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der Zellen erheblich.

4. ANWENDUNG VON DRUCK

Auch die Anwendung von Druck bewirkt eine schnelle Erwärmung und ist damit für die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen vorteilhaft.

TAYLOR (115) fand bei seinen Versuchen mit Corneazellen, daß die Auftaurate durch hohen Druck nicht nur erheblich erhöht wird, sondern auch, daß das Erwärmen sich um den Nullpunkt kontinuierlich vollzieht. Da am Schmelzpunkt das Eis 80 cal/g aufnimmt, kommt es gewöhnlich zu einem kurzen Anhalten bei 0°C in der Temperaturerhöhung. Dieses wird durch hohe Drucke vermieden.

Bei Anwendung eines Druckes von 2470 kg/cm^2 erhielt TAYLOR (115) eine Überlebensrate der Corneazellen von nur 20 %. Dagegen überlebten 95 % der Zellen bei einem Druck von 1050 kg/cm^2 . Dieser Druck erniedrigte auch die Auftaurate nicht.

Versuche, die Eisbildung durch hydrostatischen Druck zu beschleunigen, waren zwar darin erfolgreich, zeigten aber eine Erniedrigung der Überlebensrate der gefrorenen Zellen.

Auf die Anwendung von Druck zur Gefrierpunkterniedrigung und Unterkühlung wurde schon hingewiesen.

5. WÄRMEZUFUHR DURCH PERFUSION

Die Methode der Oberflächenkühlung und -erwärmung gewährleistet in großen Organen keine gleichmäßige Wärmeverteilung. Dagegen ermöglicht die Perfusion eine homogene und schnelle Kühlung und Erwärmung sämtlicher Organbereiche. STICKEL und M. (113) fanden bei Versuchen mit Hundenieren, daß die Auftauzeit, die normalerweise 30 - 50 % höher als die Gefrierzeit ist, durch vaskuläre Perfusion erheblich verkürzt werden konnte. Sie betrug nur noch $73\% \pm 20\%$ der Kontrollauftauzeit.

Die Perfusion kann mit biologisch inaktivem Gas und mit Flüssigkeit durchgeführt werden. JACOB und M. (42) perfundierten Hundenieren mit Heliumgas, kühlten sie auf -180°C und tauten sie durch Perfusion mit Heliumgas von Zimmertemperatur auf. Diese Organe produzierten nach Transplantation noch 2 Stunden ein klares Glomerulusfiltrat, während die Nieren, die von $-272,2^{\circ}\text{C}$ durch

Eintauchen in Salzlösung von 4° C erwärmt waren, schwerste tubuläre Schäden aufwiesen und ein blutiges Filtrat bildeten.

Häufiger als die Gasperfusion wird die Flüssigkeitsdurchströmung zur Organkonservierung angewendet. Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um die besten Bedingungen in bezug auf Druck, Menge und Zusammenstellung des Perfusates auszuarbeiten und ihre klinische Anwendbarkeit zu prüfen. Auf diese Versuche und ihre Ergebnisse wird in einem folgenden Kapitel näher eingegangen.

6. GEFRIERTROCKNEN

Eine besondere Methode der Kühlung, Lagerung und Erwärmung, also der Konservierung von Geweben ist das Gefriertrocknen. Die Darstellung dieses Prozesses, seiner praktischen Durchführung und seiner Anwendungsmöglichkeiten geht zwar über den Rahmen dieses Kapitels hinaus, doch sei, da das Gefriertrocknen eine Sonderstellung innerhalb der Gewebe- und Organkonservierung einnimmt, aus Gründen der Übersicht eine zusammenhängende Aufzeichnung an dieser Stelle erlaubt.

Unter Gefriertrocknen versteht man die Entfernung der Eiskristalle aus einem gefrorenen Präparat durch Sublimation. Im Gegensatz zu den zerstörenden Wirkungen, die beim Wasserentzug aus ungefrorenem Gewebe auftreten, bleiben beim Gefriertrocknen drei wichtige Eigenschaften des Gewebes erhalten: morphologische Struktur, Löslichkeit und chemische Beschaffenheit. Da das Trocknen aus dem gefrorenen Zustand erfolgt, findet keine Aggregation der Moleküle und keine Konzentration der Salze statt. So kann eine Proteindenaturierung nicht eintreten, vorausgesetzt, daß der restliche Feuchtigkeitsgehalt möglichst niedrig ist, gewöhnlich unter 1 %; denn Wasser katalysiert die Eiweißdenaturierung. Schon bei minimalem Wassergehalt findet eine Wechselwirkung zwischen der freien Aminogruppe des Proteins und der reduzierenden Gruppe der Glukose statt, ohne jedoch die physikalischen Eigenschaften des Gesamteiweißes sichtbar zu ändern. Ist der Feuchtigkeitsgehalt größer, so nehmen die Veränderungen zu, und es tritt Verlust der Löslichkeit ein.

Das getrocknete Gewebe zeigt eine feine poröse Struktur, die den entfernten Eiskristallen entspricht. Die Größe der Hohlräume wechselt zwischen einigen Mikron und 0,2 μ und, wie die Elektronenmikroskopie gezeigt hat, noch darunter (32). Sie nimmt von der Oberfläche nach innen zu, da die Kühlrate fortschreitend gegen das Innere des Gewebes abnimmt.

Der Vorgang des Trocknens erfolgt in drei Schritten. Die zur Sublimation nötige Energie muß als Wärme zugeführt werden, damit die Temperatur des Gewebes nicht so weit herabsinkt, daß keine Sublimation mehr möglich ist.

Findet die Sublimation in einem geschlossenen Behälter statt, steigt die Wasserdampfkonzentration in der Umgebung des Eiskristalles an. Wird der Wasserdampf nicht von der Trockengrenze entfernt - dieses ist der 2. Schritt im Trockenprozeß -, kehrt das Wassermolekül zum Eiskristall zurück.

Der Wasserdampf muß die an Dicke zunehmende Hülle des getrockneten Materials durchqueren. Dabei folgt er dem Diffusionsgefälle. Der der Diffusion entgegengesetzte Widerstand ist ziemlich hoch. Er wird aber durch ein äußeres Vakuum herabgesetzt; denn dieses erniedrigt die Konzentration der Gasmoleküle in den Zwischenräumen des Gewebes.

Der 3. Schritt ist die Reduktion des Dampfdruckes auf der Oberfläche des Präparates. Dadurch, daß die Wasserdampfmoleküle von der Oberfläche entfernt werden, wird das Konzentrationsgefälle größer und die Diffusion verbessert. Der Trockenprozeß wird beschleunigt.

Da nur 90 % des Gewebswassers freies Wasser ist und der Restfeuchtigkeitsgehalt nach dem Gefriertrocknen unter 1 % liegen soll, muß auch ein großer Teil des gebundenen Wassers entzogen werden. Solange das Gewebe gefroren ist, tritt dadurch keine Schädigung ein. Diese setzt erst bei der Rehydrierung ein. MERYMAN (75) erkannte die Schutzwirkung von Dextran und PVP in hohen Dosen während der Rehydrierung. Sie besteht darin, daß während der Rehydrierung eine Schutzhülle um die Zellmembran gebildet wird. Dadurch ist das Eindringen des Wassers in die dehydrierte Zelle erschwert und eine langsame Wiederherstellung der Membran- und Zellstruktur möglich.

Obwohl Glycerin ein gutes Schutzagens gegen Gefrierschäden ist, ist es auf Grund seiner physikalischen Eigenschaften als Schutzmittel gegen die Schäden des Gefriertrocknens nicht geeignet (94).

Das Trocknen des Gewebes setzt eine vollständige Kristallisation voraus. REY (88) hat an Glycerin-Wasserlösungen festgestellt - und diese Ergebnisse können auf das Protoplasma übertragen werden -, daß nur ein Teil der Lösung auskristallisiert, daß der andere Teil durch langsames Zunehmen der Viskosität erstarrt. Um eine vollständige Kristallisation zu erreichen, erwärmt er das tiefgekühlte Material so weit, daß die Devitrifikation - oder besser Rekristallisation - einsetzen kann. Nach abgeschlossener Kristallisation wird das Präparat auf die erforderliche Trockentemperatur gebracht. Diese ist für jedes Gewebe verschieden.

Die Zufuhr der nötigen Wärme erfolgt durch Leitung von einer Heizplatte aus, durch Strahlung einer Infrarotquelle oder durch hochfrequente Strahlung im Mikrowellenbereich. Von diesen Methoden wird die erste am häufigsten angewendet. Die Wasserdampfpassage durch die getrocknete Schale kann nur dadurch verbessert werden, daß das Konzentrationsgefälle erhöht wird, d. h., daß der Dampfdruck an der Oberfläche erniedrigt wird. Den Widerstand in der Trocken-

zone ganz aufzuheben, ist unmöglich. Eine Methode, den Wasserdampf zu entfernen, ist die Überführung der Moleküle durch einen evakuierten Raum auf eine kondensierende, tief temperierte Fläche oder in hygroskopische Stoffe wie Phosphorpentoxyd, Calciumchlorid und Calciumsulfat oder in Absorbentien wie Kieselsäure und Anhydride. Bei einem anderen Verfahren, das 1959 von MERYMAN (74) ausgearbeitet wurde, werden die Wassermoleküle bei atmosphärischem Druck von einem Strom trockener Luft weggefeht. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Erhöhung des Widerstandes in der getrockneten Schale.

Eine andere Gefriertrockenmethode ist die Flüssigkeitssubstitution. Das getrocknete Präparat wird in eine dehydrierte Flüssigkeit getaucht, deren eutektischer Punkt mit Wasser unterhalb der Temperatur, bei der das Gefriertrocknen ausgeführt wird, liegt. Dieses Verfahren wird hauptsächlich zur Präparation histologischer Schnitte angewendet.

FLOSDORF (30) entwickelte eine Methode, die das Gefriertrocknen im Vakuum unter aseptischen Verhältnissen ermöglichte. Das Material wird in Behälter gegeben, auf -78°C gefroren und getrocknet, bis ein Feuchtigkeitsendgehalt von weniger als 1 % erreicht ist. Ohne Aufhebung des Vakuums werden die Behälter versiegelt.

Dieses Verfahren diente im 2. Weltkrieg zur Konservierung von riesigen Mengen Blutplasma, das wegen seines geringen Volumens gut aufbewahrt und transportiert werden konnte und vor Gebrauch schnell mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde.

STRUMIA (114) behandelte Blutplasma und Erythrocyten vor der Konservierung mit Antikoagulantien, mit Citratlösung oder mit Zitronensäure-Dextrose-Lösung (ACD). Während die Citratlösung für das Plasma ausreichend ist, muß bei den roten Blutzellen ACD verwendet werden. Die Trockentemperatur für Plasma liegt zwischen -20°C und -72°C . Beim Trockenprozeß muß darauf geachtet werden, daß die Schnelligkeit, mit der der Wasserdampf entfernt wird, genügend groß ist, um das gefrorene Plasma auf der Temperatur zu halten, die eine optimale Konservierung der labilsten Fraktionen gewährleistet. Das Vermeiden des Auftauens allein reicht nicht aus.

STRUMIA (114) konservierte außer Plasma und menschlichen Erythrocytensuspensionen auch menschliches Serum und die Globinfraktion der roten Blutkörperchen mit gutem Erfolg.

1949 berichteten POLGE, SMITH und PARKES (85) über Versuche mit Spermien. Sie kühlten Geflügelsamen in Glycerin-Ringer-Lösung auf -79°C , entzogen mehr als 90 % des Wassers und erwärmten das Material auf 40°C . Die optimale Glycerinkonzentration war 30 %. Dabei betrug die Überlebensrate mehr als 50 %. Über die Fruchtbarkeit konnte keine Aussage gemacht werden.

MERYMAN (75) fand, daß Bullensamen mit Eigelb und Citrat gemischt,

auf -30°C gefroren und getrocknet, 40 - 50 % hochaktiver, zeugungsfähiger Spermien enthielt. Dieser Samen wurde allerdings nicht aufbewahrt, sondern sofort rehydriert und mit Erfolg inseminiert.

Während die Langzeitkonservierung von gefrorenem Samen bei tiefen Temperaturen erfolgreich durchgeführt werden kann, unterliegt getrocknetes Material während der Lagerung bei Zimmertemperatur vielen Einflüssen. Entscheidend für die Stabilisierung sind Restfeuchtigkeit, Dampfdruck und umgebende Atmosphäre. Bei Konservierung im Vakuum werden die besten Ergebnisse erreicht, in Luft und Sauerstoff die schlechtesten und mittelmäßige in Stickstoff, Wasserstoff und Kohlendioxyd (31). PARTMANN (82) konnte diese Beobachtung bei Versuchen mit gefriergetrockneter Rinder- und Karpfenmuskulatur bestätigen. Im Verlauf von 1 1/2 Jahren Lagerung in Luft nahmen die Myosinextrahierbarkeit und die ATP-ase-Aktivität deutlich ab. Dagegen waren sie bei Vakuumkonservierung nur wenig reduziert. Die Oxydation der Proteinfraction ist eine der wesentlichen Veränderungen bei der Lagerung in Sauerstoffgegenwart.

Die Methode des Gefriertrocknens wird weiterhin erfolgreich angewendet auf Viren (34), auf Bakterien (31), auf Antibiotica (103), auf Vitamin-, Hormon- und andere pharmazeutische Präparate (30) und auf Muttermilch (69), die sich im Gegensatz zur pasteurisierten und tiefgefrorenen Milch nur durch den Verlust von Vitamin C von der frischen unterscheidet.

Die Gewebekonservierung mit Hilfe des Gefriertrocknens hat dagegen nur teilweise Erfolge gezeigt. Obwohl die morphologische Struktur und die biochemische Zusammensetzung einschließlich des Enzymsystems beim Trocknen aus dem gefrorenen Zustand erhalten bleiben, müssen die Gewebe erst den Gefrierprozeß ohne Schaden überstehen. Auf Gewebe und Organe, die schon durch das Gefrieren auf tiefe Temperaturen geschädigt werden, kann dieses Verfahren nicht angewendet werden; denn es ist unwahrscheinlich, daß das Trocknen die Gefrierschaden aufhebt. So scheiden viele Gewebe - wenigstens unter den heutigen Bedingungen - für diese Methode aus, z. B. die Cornea (11).

Blutgefäße werden durch das Gefriertrocknen gut konserviert. HUFNAGEL (37) transplantierte frische, gefrorene und gefriergetrocknete Arteriensegmente homologplastisch und fand keinen Unterschied in den Transplantationsergebnissen. WEISS und TAYLOR (128) verwandten erfolgreich gefriergetrocknete Arteriensegmente als Gewebebrücken anstelle von Nerventransplantaten bei Ratten, Kaninchen und Affen. Das Arterienstück diente als Leitbahn für die neugebildeten Nervenfasern. Gefriergetrocknete Nerventransplantate dagegen erwiesen sich wegen der einsetzenden immunologischen Reaktion als unbrauchbar, obwohl die Präparate vor der Transplantation normal erschienen (11). Zwar bewirkt nach BELTRAN und BLUMENTHAL (9) das Gefriertrocknen eines Transplantats die Unterdrückung der immunologischen Reaktion von Seiten des Empfängers, doch

kann diese Beobachtung, die am Nierengewebe gemacht wurde, sicher nicht auf alle Gewebe übertragen werden.

Die Methode des Gefriertrocknens wurde auch bei Hautepithel angewandt (11). Das Epithel von Kaninchenohrhaut, das nach Entfernen 70 % Wasser enthielt, überstand eine Austrocknung bis zu einem Feuchtigkeitsgehalt von 25 %. Eine stärkere Dehydrierung war tödlich. Die Behandlung mit Glycerin erhöhte die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Gefriertrocknen nicht. Diese Beobachtung wurde später von ROWE (94) bestätigt.

Die Übersicht über die Versuche des Gefriertrocknens und ihrer Ergebnisse zeigt, daß trotz der Vorteile dieser Methode gegenüber dem Gefrieren die Anwendungsmöglichkeiten für biologische und klinische Zwecke begrenzt sind. Nur wenige Zellgruppen und Gewebe können bisher durch dieses Verfahren lebens- und funktionsfähig erhalten werden. Dazu gehören in erster Linie Blut, Blutzellen, Spermien und Gefäße. Eine Verfeinerung der Methoden und Mittel könnte jedoch die Ergebnisse verbessern und den Anwendungsbereich erweitern. In der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie ist das Gefriertrocknen schon seit langer Zeit ein Routineverfahren, das an Ausmaß und Bedeutung immer mehr zunimmt.

7. DISKUSSION

Die Darstellung der verschiedenen Methoden der Kühlung, Lagerung und Erwärmung hat die praktischen Schwierigkeiten, die sich bei der Kältekonservierung ergeben, aufgezeigt. Gerade in dem kritischen Temperaturbereich zwischen 0°C und -40°C ist ein homogenes und schnelles Kühlen bzw. Erwärmen erschwert.

Die Kühlrate darf wegen der Gefahr des Kälteschocks nicht zu hoch sein, andererseits müssen die Bildung großer Eiskristalle und das lange Einwirken der erhöhten Salzkonzentration bei langsamem Kühlen vermieden werden. Um die Rekristallisation während des Auftauens zu verhindern, muß die Auftaurate entsprechend hoch sein. Besonders wichtig ist die gleichmäßige Wärmeverteilung beim Kühlen und Erwärmen im Temperaturbereich um den Nullpunkt, um die Unterschiede der biochemischen Reaktionsraten nicht noch zu vergrößern.

Entscheidend für die Wahl der Methode ist nicht nur die erforderliche Kühl- bzw. Auftaurate, sondern auch die Art, Beschaffenheit und Größe des Objektes. Das Verfahren der Oberflächenkühlung kann für das langsame, schnelle und ultraschnelle Kühlen von Zellsuspensionen, Gewebestücken und kleinen Organen erfolgreich angewendet werden. Das rasche und homogene Gefrieren großer Organe dagegen wird durch die Perfusionstechnik ermöglicht. Das Perfusat durchströmt sämtliche Organbereiche gleichmäßig und kühlt sie entsprechend

der Temperatur und dem Druck der Flüssigkeit mehr oder weniger tief und schnell. Durch Zugabe von Gefrierschutzmitteln kann das Organ rasch und vollständig damit durchtränkt werden. Auch die Perfusion mit biologisch tragem Gas wie Helium und Stickstoff ist erfolgreich angewandt worden. Vorteile dieses Verfahrens gegenüber der Flüssigkeitsperfusion haben sich nicht gezeigt. Die Kombination von Oberflächen- und Perfusionskühlung schafft die beste Voraussetzung für ein schnelles und gleichmäßiges Gefrieren.

Beide Methoden ermöglichen auch die Erwärmung von Zellen und Geweben. Während die Wärmezufuhr durch Oberflächenkontakt bei kleinen Objekten angewendet werden kann, werden nur mit Hilfe der Gas- und Flüssigkeitsperfusion große Organe gleichmäßig erwärmt. Dieser Prozeß verläuft relativ langsam. Beide Verfahren, allein oder kombiniert, erreichen nicht die hohe Auftaurate von mehreren hundert Grad in der Minute.

Die Methode der Kurzwellendiathermie und die Anwendung von hydrostatischem Druck scheinen die schnelle und ultraschnelle Erwärmung von Geweben zu ermöglichen. So wurde die Auftauzeit durch die 27 Megahertz-Diathermie auf $1/4$ der Zeit reduziert, die beim Auftauen im Wasserbad nötig war (102). Die Anwendung von Druck führte bei Versuchen von TAYLOR (115) zu einer erheblichen Erhöhung der Erwärmungsgeschwindigkeit. Andererseits konnte durch Druck die Eisbildung beschleunigt werden. Da jedoch die Überlebensrate durch diesen Prozeß erniedrigt wurde, scheidet die Druckerhöhung als Kühlverfahren aus.

Die Anwendung von Druck wurde von TAYLOR als eine Möglichkeit der schnellen und ultraschnellen Erwärmung angesehen. Da er jedoch seine Beobachtungen an Zellsuspensionen machte, müssen weitere Versuche die Wirkung und die Anwendbarkeit von Druck auf Gewebe und Organe klären.

Auch die Wirkung der Diathermie muß noch intensiver untersucht und ihre Technik verfeinert werden.

KAROW und WEBB (46) sehen in der Wärmestrahlung von extrem hoher Stärke eine weitere Möglichkeit, Präparate schnell und wirksam zu erwärmen. Doch sind zur Entwicklung eines solchen Verfahrens noch zahlreiche Versuche erforderlich.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die bisher entwickelten Methoden zwar nicht optimal sind, daß aber doch einige wie die Oberflächenkühlung bzw. -erwärmung und die vaskuläre Perfusion wirksam und erfolgreich angewendet werden können. Jedes Verfahren ist in bezug auf Kühlrate und Anwendungsgebiet begrenzt, doch kann es durch ein anderes ergänzt und erweitert werden. Andere Methoden sind zwar in ihrer Wirksamkeit erkannt, doch müssen sie, um erfolgreich angewendet werden zu können, noch genauer untersucht und weiterentwickelt werden.

Da das Gefriertrocknen letztlich eine Methode der Gewebe- und Organkonservierung ist, soll es an anderer Stelle diskutiert werden.

VI. REAKTION DER ZELLEN, GEWEBE UND ORGANE

1. ZELLEN

a) Blutzellen

Die Bluttransfusion ist heute eine der wichtigsten und oft lebensrettenden Maßnahmen in der Medizin. Da nur selten frisches Blut zur Verfügung gestellt werden kann, ist die Konservierung von Blut und Blutzellen erforderlich. Sie wird u. a. durch die Anwendung der Hypothermie ermöglicht.

Nachdem POLGE, SMITH und PARKES (85) die Schutzwirkung des Glycerins gegen Gefrierschäden bei Spermien erkannt hatten, wurde sie auch für Erythrocyten bewiesen (109). Durch das Eindringen des Glycerins in die Zellen wird die Salzkonzentration nicht erhöht, und die Erythrocyten hämolysieren nicht. Den Nachweis erbrachten LOVELOCK und BISHOP (61) mit Hilfe von Kupferionen, die das Einwandern des Glycerins verhindern und damit die Hämolysen bewirken.

Bei einer Glycerinkonzentration von 3 M (30 %) und einem pH von 6,9 überleben 95 % der Zellen das Gefrieren und Auftauen von -79°C , und mehr als 91 % sind 24 Stunden nach Transfusion noch funktionsfähig. Die Lagerdauer kann bis auf zwei Jahre ausgedehnt werden. Um bei Erhöhung der Lagertemperatur auf -15°C , -20°C und -40°C und bei langer Lagerzeit ebenso gute Ergebnisse zu erhalten, muß die Glycerinkonzentration zwischen 4 M und 5 M liegen (106).

Um eine Hämolysen zu vermeiden, muß vor der Transfusion das Glycerin entfernt werden; denn die Wassermoleküle dringen schneller in die Erythrocyten ein, als das Glycerin austreten kann. Der Entzug des Glycerins kann durch zentrifugales Waschen mit Glukose- oder konzentrierten Salzlösungen, für die die Zellmembranen impermeabel sind, erreicht werden. Nach 2 1/2 Stunden Waschen ist die Glycerinkonzentration von 30 % auf 0,6 % reduziert.

O'BRIEN und M. (79) verwandten mit Glycerin behandeltes Blut als massiven und ausschließlichen Blutersatz. Das Blut wurde mit Glycerin gemischt, stufenweise konzentriert und Plasma und Erythrocyten getrennt. Nach langer Lagerung bei -80°C wurde beides aufgetaut, das Glycerin wurde entzogen, und die Erythrocyten wurden bei 4°C in ihrem Plasma oder in 5 %iger Albuminlösung resuspendiert. Eine Stunde vor der Transfusion wurde das Blut auf 37°C erwärmt.

Nach Infusionen dieses Blutes, das in Mengen bis zu 500 % des Gesamtblutvolumens gegeben wurde, zeigten sich keine Veränderungen, die von denen abwichen, die nach Infusionen von frisch heparinisiertem oder mit ACD behandeltem Blut beobachtet wurden. Es kam auch nicht zum Auftreten einer hämorrhagischen Diathese, obwohl in mehreren Fällen als ausschließliches Suspensionsmittel 5 % Albuminlösung, die frei von Blutplättchen und agglutinierenden Faktoren ist, genommen wurde.

Diese klinische Beobachtung wurde von WALLACH und M. (121) durch Laboruntersuchungen erhärtet. Diese untersuchten den Kationen-Strom und die extra- und intrazellulären Konzentrationen von Na, K, Ca, Mg, Cl^- und PO_4^{---} an frischem ACD-Blut und an gefrorenem, mit Glycerin behandeltem Blut. Es zeigte sich, daß verlängertes und tiefes Gefrieren und Glycerinbehandlung die aktiven Transportprozesse der Erythrocyten, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Elektrolytkonzentration verantwortlich sind, nicht wesentlich verschlechtern. Die Erythrocyten sind also metabolisch aktiv und für einzelne und massive Transfusionen verwendbar.

VALERI und HERDERSON (120) berichteten kürzlich von aufgetretenen Komplikationen bei 14 operierten Patienten nach Transfusion von mit Glycerin konservierten Erythrocyten, die in 5 % Albuminlösung suspendiert waren. Es trat eine Hämoglobinurie mit und ohne akute Niereninsuffizienz auf. Sie trat nicht nach Infusion von Erythrocyten in autologem Plasma auf. O'BRIEN und M. (79) machten schon 1961 die Beobachtung, daß Patienten, die während einer Herzoperation Transfusionen von konserviertem Blut erhielten, eine reversible renale Dysfunktion mit erhöhtem Rest-N und reduzierter Urinkonzentrationsfähigkeit zeigten. Die aufgetretene Hämoglobinurie dauerte nur einen Tag an. Die Ursache mag darin liegen, daß der Albuminlösung ein Faktor, das Plasma α_2 -Globulin, fehlt, der das freiwerdende Hämoglobin der nicht lebenden und der während der Operation in großem Ausmaß extravaskulär zerstörten Erythrocyten bindet.

Außer durch Glycerin werden die roten Blutkörperchen durch Glukose, Laktose, Dextran und PVP geschützt. Die Zugabe von 7 % Glukose bewirkt eine Wiederherstellung von 98 % der Erythrocyten und eine Überlebensrate im Blutkreislauf von 90 % (73).

RINFRET und M. (90) verwandten PVP und PVP-Albumin als Schutzmittel. Sie gefroren die roten Blutzellen in 60 - 90 sec auf -196°C , lagerten sie bei Temperaturen zwischen -170°C und -196°C und tauten sie schnell im Wasserbad auf. Mehr als 95 % der Zellen überlebten. BLOOM und M. (18) untersuchten die Lebensfähigkeit in vivo und erhielten 24 Stunden nach Transfusion einen Wert von 70 - 85 %.

HUGGINS (39, 40) untersuchte die Anwendbarkeit von DMSO auf Erythrocyten und entwickelte eine einfache Methode, große Blutmengen zu konservieren. Ein optimaler Gefrierschutz wurde erreicht, indem mit ACD behandeltem Blut stufenweise 8 % Glukose in 8,6 M DMSO-Lösung zugegeben und dieses auf -85°C gefroren wurde. Nach Auftauen entzog man das DMSO durch Hinzufügen von 10 % Glukose. Bei Lagerzeiten bis zu 42 Tagen betrug die Hämolyse weniger als 5 %. Das Konzentrieren der Erythrocyten nach den verschiedenen Verdünnungen erfolgte durch Änderung des pH-Wertes und die dadurch bedingte reversible Zusammenballung. Durch diese einfache Methode werden das kompliziertere Dialysieren und Zentrifugieren vermieden und die breite Anwendung ermöglicht.

Die Kältekonservierung von Leukocyten wurde von CAVINS und M. (19) durchgeführt. Sie kühlten die weißen Blutzellen langsam in 10 %iger DMSO-Lösung auf -80°C und tauten sie nach einer Lagerung von 3 Tagen bis 6 Wochen schnell ohne vorhergehenden Entzug des DMSO auf. Diese Leukocyten wurden autolog tödlich bestrahlten Hunden injiziert. Drei der neun Hunde zeigten eine vollständige Hämatopoese, drei eine beginnende, und drei starben, da die Zahl der injizierten Zellen unterhalb der kritischen Grenze lag.

COHEN und GARDNER (21) untersuchten die besten Bedingungen für die Konservierung von Blutplättchen. Die Aufrechterhaltung des Plasmamilieus wurde als sehr wichtig angesehen. Glycerin, Dextrose und Sorbitol wurden zu den Blutplättchenkonzentraten gegeben. Die optimale Glycerinkonzentration lag zwischen 7,5 und 10 %. Nach Gefrieren auf -70°C und anschließendem Auftauen betrug die Lebensdauer 65 % des Höchstwertes.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Gefrierkonservierung von Blut und Blutzellen, die eine dringende Notwendigkeit ist, mit Erfolg durchgeführt wird. Die Tiefkühlung ermöglicht eine Langzeitaufbewahrung ohne wesentliche Reduktion der Überlebensrate.

b) Spermien

Nach der Entdeckung der Schutzwirkung des Glycerins auf Spermien 1946 von ROSTAND (93) und später von POLGE, SMITH und PARKES (85) sind zahlreiche Versuche unternommen worden, optimale Bedingungen für die Konservierung von Samen zu finden.

Untersuchungen haben ergeben, daß Glycerin das beste Gefrierschutzmittel für Spermien ist. Propylenglykol, Äthylenglykol und DMSO sind im allgemeinen nicht so wirksam wie Glycerin (61, 85).

Nach vielen Versuchen wurde folgende Methode zur Konservierung von Bullensamen ausgearbeitet. Der Samen wird zu gleichen Teilen mit Eigelb-

Citrat-Lösung gemischt und in 4 Stunden auf 5°C gekühlt. Dann wird dieselbe Menge eines Citratpuffers, der 20 % Glycerin enthält, zugegeben. Nach 12 - 20 Stunden, in denen das Glycerin in die Spermien eindringen kann, wird die Probe auf -79°C gekühlt und kann bei dieser Temperatur mehrere Jahre ohne starke Reduktion der Fruchtbarkeit aufbewahrt werden. Nach einjähriger Lagerung wurden 75 % der inseminierten Kühe trächtig, nach $4\frac{1}{2}$ Jahren noch 66,7 % (106).

Diese Methode ist vielfach abgeändert worden, doch das Grundprinzip ist erhalten geblieben. So ist die Zusammensetzung der Lösung oft variiert worden. Als optimal kann folgende angesehen werden: 25 % Eigelb, 2 % Natriumcitrat und 7,5 % Glycerin. Wird der Samen mit Milch gemischt, sollte die Glycerinkonzentration 10 - 13 % betragen (106). Die Kühlrate von $1^{\circ}/\text{min}$ bis -15°C und von $5^{\circ}/\text{min}$ bis -79°C kann in beschränktem Maße verändert werden. Da trotz der tiefen Lagertemperatur von -79°C eine leichte Verminderung der Fruchtbarkeit festzustellen ist, hat man die Temperatur mit Erfolg auf -90°C gesenkt.

Die Konservierung von Geflügelsamen ist weniger erfolgreich. Selbst die Aufbewahrung bei -190°C ergibt eine fortschreitende Verminderung der Beweglichkeit und Fruchtbarkeit der Spermien (106).

SAWADA und CHANG (96) untersuchten Kaninchensperma, das sie mit 35 %iger DMSO-Lösung mit Fruktose und Glycin versetzten, auf -79°C kühlten, 1 - 3 Tage lagerten und im Wasserbad von 37°C erwärmten. 25 % der Spermien waren beweglich. Bei Kaninchenspermien erwies sich DMSO wirkungsvoller als Glycerin, bei dem unter denselben Versuchsbedingungen nur 10 % der Samenfäden beweglich waren.

Pferde-, Schweine-, Hunde-, Ziegen- und Schafsamensamen sind wenig untersucht worden, und ihre Konservierung hat nur geringe praktische Bedeutung. Auch sind einige Versuche, menschliches Sperma aufzubewahren, unternommen worden.

Die bisherigen Untersuchungen von Samen haben die Möglichkeit der Kältekonservierung der Spermien bestätigt. Unter entsprechenden Bedingungen, die bei den einzelnen Arten variiert werden müssen, können die Samenfäden jahrelang ohne starke Einschränkung der Beweglichkeit und Fruchtbarkeit aufbewahrt werden. Diese Tatsache hat zahlreiche Möglichkeiten in der Viehzucht eröffnet. Durch die Einrichtung von Samenbanken ist der Anfang gemacht worden.

2. GEWEBE

a) Knochen, Knorpel

Die Konservierung von Knochen und Knorpel, deren Matrix hart und relativ träge ist, erweist sich als nicht schwierig. Die Zellen, selbst die eines frisch entfernten und transplantierten Gewebes, sterben bald nach der Übertragung ab und sind für den Heilungsprozeß bedeutungslos. Daher sind die durch Kochen oder Autoklavieren abgetöteten Knochen und Knorpel ebenso wirksam wie lebende Transplantate. Sie werden nur als Gerüst verwendet, in das der Empfänger neues Gewebe einbaut. So reicht die Aufbewahrung in einer aseptischen und erhaltenden Flüssigkeit wie Merthiolat aus. Knorpel wird auf diese Art konserviert, während Knochenstücke in gefrorenem Zustand bei -20°C bis -30°C aufbewahrt werden.

Von rein wissenschaftlicher Bedeutung sind Versuche, bei denen Tibiaknochen mit ihren knorpeligen Epiphysen von Hühnerembryos mit 15 %igem Glycerin behandelt und langsam auf -79°C gefroren wurden. Während die Gewebe von sechs-Tage-alten Embryos unverändert waren, zeigten die Epiphysen der sieben-Tage-alten Embryos geringe Nekrosen und die Diaphysen starke und ausgedehnte Nekroseherde. In 24 Stunden war die Matrix so verändert worden, daß sie das Glycerin nicht mehr annahm und zu den übrigen Zellen passieren ließ. Knorpelgewebe kann bei tiefen Temperaturen nur durch Glycerin geschützt werden, wenn die Zellen von der Matrix getrennt sind (106).

Diese interessanten Versuche dienen nur dem Verständnis der embryonalen Entwicklung von Skelettstrukturen, haben aber keine praktische Bedeutung.

b) Arterien

JOSHI und BLUMENTHAL (44) untersuchten die Wirkungen des Gefrierens unter Glycerinschutz an der transplantierten Aorta. Sie stellten fest, daß nach Tiefgefrieren auf -80°C und -190°C das Gewebe wesentlich besser erhalten war und die Empfängerreaktion erheblich verringert war als nach Gefrieren auf -10°C . In den Transplantaten, die auf -190°C gefroren worden waren, zeigte sich eine Regeneration des Endothels. Die Muskelfasern waren degeneriert und gelegentlich calcifiziert. Die elastischen Fasern waren nur leicht geschwollen und die Adventitia gering lymphocytär infiltriert.

Daraus ergibt sich, daß tiefes Gefrieren eine gute Konservierung der Gefäße ermöglicht und ihre Übertragbarkeit verbessert. Dieses wurde auch von anderen Autoren bestätigt. Schnelles Gefrieren und Aufbewahren in festem Kohlendioxyd bei -79°C ergeben Transplantate, die sich nicht von frisch entnommenen unterscheiden (11).

c) Nerven

Der kritische, schädigende Temperaturbereich für Nervenzellen und -fasern liegt zwischen -5°C und -15°C . Wird das Präparat in Krebs-Lösung schnell auf -79°C gefroren, ist es zerstört. Dagegen zeigt es nach Glycerinbehandlung und Gefrieren auf dieselbe Temperatur gleich große Aktionen wie vor dem Gefrier-Auftauprozeß (106).

Die irreversible Schädigung der Nervenfasern wird verursacht durch die Änderung des Verhältnisses von Natrium- zu Kaliumionen unter 0°C . Der Schutzmechanismus des Glycerins kann nicht nur in seiner Pufferwirkung liegen. Er muß diesbezüglich noch näher geklärt werden.

d) Haut

Die beste Methode der Langzeitkonservierung von Haut ist langsames Gefrieren und schnelles Auftauen nach Vorbehandlung mit Glycerin. Obwohl die Melanocyten und die Malpighischen Zellen in Ringerlösung diesen Prozeß nicht überstehen, werden sie durch 15 % Glycerin in Ringerlösung ausreichend geschützt. Bei einer Lagertemperatur von -79°C kann die Haut länger als ein Jahr aufbewahrt werden und unterscheidet sich nach schnellem Auftauen und Transplantation nicht von einem frischen Transplantat (11).

Zwei andere ausgezeichnete Verfahren ermöglichen die kurzzeitige Aufbewahrung von Hautgewebe. In Gaze, die mit physiologischer Salzlösung durchtränkt ist, eingehüllte Haut bleibt unter Verschluss bei $3 - 6^{\circ}\text{C}$ 8 Wochen erhalten. Hautgewebe, das in 10 % Serum in physiologische Salzlösung bei 5°C getaucht ist, kann in Gegenwart von Luft 4 Wochen aufbewahrt werden.

Alle Homoiotransplantate werden unabhängig von der Konservierungsmethode nach kurzer Zeit abgestoßen. Die tiefe Hypothermie bewirkt keine Verlängerung der Toleranz des Empfängers, noch beeinflusst sie den Abstoßungsvorgang eines autologen Hautgewebstückes bei der Ratte (42).

e) Cornea

Die Übertragung von Hornhaut ist inzwischen schon ein Routineverfahren geworden. Doch ist es noch nicht lange möglich, die Cornea so zu konservieren, daß sie klar bleibt. Versuche, Hornhautscheiben zu gefriertrocknen, mit 50 - 100 % Glycerin zu dehydrieren, mit Formalin zu behandeln oder mit Glycerin auf tiefe Temperaturen zu gefrieren, sind fehlgeschlagen. Die Struktur der Cornea war zwar erhalten, doch die Zellen waren tot.

Soll die Hornhaut klar bleiben, muß das Endothel zur Zeit der Überpflanzung leben. Da das Endothel eine wasserdichte Schicht bildet, verhindert es die

Durchtränkung des Stromas mit Kammerwasser. Ödematöses Stroma ist trüb. Das äußere, wasserdichte Epithel wird schnell durch einwachsende Empfängerzellen ersetzt. Die Endothelzellen jedoch wachsen sehr langsam und werden erst nach vielen Monaten ersetzt. Klare Corneatransplantate hängen also von der Lebensfähigkeit des Endothels ab (107).

Untersuchungen haben ergeben, daß die Hornhaut für Glycerin und DMSO undurchlässig ist. In Glycerinlösung löst sich das Endothel ab. Kommt das äußere Plattenepithel mit DMSO in Berührung, wird es zerstört. Nach vielen Versuchen haben SMITH, ASHWOOD-SMITH und YOUNG (108) folgende Methode entwickelt. In die vordere Augenkammer wird 7,5 % DMSO gespritzt, das gesamte Auge in 10 % Glycerin-Serum-Lösung getaucht und auf -79°C gekühlt. Nach einer Lagerzeit von einer Stunde bis zu 61 Tagen blieb in 26 von 33 Fällen die transplantierte Hornhaut klar (77).

f) Muskulatur

Versuche, Muskulatur vor den Gefrierschäden zu schützen und zu konservieren, sind bisher noch nicht erfolgreich gewesen.

FARRANT (28) untersuchte die Uteri von Guinea Meerschweinchen. Nach dem Gefrieren auf -30°C oder -79°C in veränderter Krebs-Lösung war die Muskulatur schwer geschädigt und antwortete nicht mehr auf Reizmittel wie Histamin. Durch Zugabe von 1,4 M DMSO wurde die kontraktile Substanz nur teilweise geschützt. Die Antworten auf Histamin waren abgeschwächt. Je tiefer die Temperatur, desto geringer die Antwort, desto größer der Schaden. Die größte Schädigung trat zwischen -15°C und -30°C auf. Ein bedeutender Faktor gerade in diesem Bereich war die Kühlrate. Bei langsamer Temperatursenkung war der Schaden größer als bei schneller. Die Endtemperatur war weniger entscheidend.

Der Sitz des Schadens in der Muskulatur ist nicht geklärt. Die Tatsache, daß Muskeln nach Gefrieren und Auftauen in Lösungen mit reduziertem Calciumgehalt eine Spontanaktivität zeigen, läßt vermuten, daß die Zellmembran geschädigt wird. Die Muskelfasern sind sehr empfindlich gegenüber Änderungen des Verhältnisses von Calcium zu Natrium und Kalium. Diese und Wechsel des pH-Wertes verursachen die Denaturierung der Membranlipoproteine, des Myoglobins und anderer Zellproteine. Die teilweise Schutzwirkung des DMSO ist auf die Senkung der Salzkonzentration zurückzuführen. In höheren Konzentrationen, die zum Schutz erforderlich sind, kommt es zu osmotischen Veränderungen. Das Gewicht der Uteri war nach Eintauchen in eine 1,4 M DMSO-Lösung schnell reduziert. Doch auch nach Erreichen des Anfangsgewichtes blieben die Antworten auf Histamin blockiert. Es muß also noch ein anderer schädigen-

der Mechanismus eintreten. So lange man diesen nicht kennt, ist es nicht möglich, die Muskulatur vollständig vor Gefrierschäden zu schützen.

Andere Schutzmittel wie Methyl- und Dimethylformamid, Methyl- und Dimethylacetamid gaben auch nur einen geringen Gefrierschutz (28).

g) Tumoren

Um den Einfluß der Hypothermie auf das Wachstum und die Fähigkeit zur Metastasierung von Tumoren zu untersuchen, sind zahlreiche Versuche unternommen worden (11). Viele Tumoren können lange bei tiefen Temperaturen ohne Verlust ihrer Wachstumsfähigkeit aufbewahrt werden. Das Überleben einiger Tumorzellen genügt, Metastasen zu setzen. JACOB und M. (42) untersuchten das subkutane Chlorom bei Ratten und stellten keinen Rückgang des Tumorwachstums nach leichter (rekt. Temp. 20 - 22° C) und tiefer Hypothermie (rekt. Temp. 1° C) und nach Kälteadaptation bei 4° C fest.

Menschliche Tumorzellsuspensionen, die in 10 % Glycerin und 10 % menschlichem Serum mit Eagle-Lösung langsam auf -70° C gefroren wurden, konnten ohne Verlust der Lebensfähigkeit lange bei dieser Temperatur aufbewahrt werden und nach Injektion Metastasen bilden. Allerdings war für die Wirksamkeit und "Annahme" des Carcinoms eine bestimmte Zellzahl (10^6) notwendig. Die konservierten Zellen setzten ebenso viele Metastasen wie frische, die durch Behandlung des Tumorgewebes mit Trypsin und Kollagenase erhalten wurden (119).

Die Hoffnungen, die Hypothermie als therapeutische Maßnahme zur Zerstörung der Carcinomzellen und zur Einschränkung des Tumorwachstums anzuwenden, haben sich also nicht erfüllt.

h) Knochenmark

Die Konservierung des Knochenmarks wurde erst durch die Anwendung von Gefrierschutzmitteln möglich. Ohne diese zeigte das Gewebe nach Gefrieren und Auftauen von -79° C starke Kernpyknosen und Cytoplasmaverluste bei den reiferen Zellen. Die Protein- und Lipidsynthese waren gestört. Diese Schäden traten unter Gefrierschutz nicht mehr auf. Wurde das Knochenmark mit Glycerin behandelt, auf -79° C gefroren und tödlich bestrahlten Mäusen injiziert, so überlebten die Tiere (107).

Eine Verbesserung der Überlebensrate von Knochenmarkszellen erreichte ASHWOOD-SMITH (6) dadurch, daß er das Gewebe mit 10 % oder 15 % DMSO vor dem Gefrieren auf -79° C behandelte. 70 % der gefrorenen Zellen überlebten, während von den mit Glycerin behandelten weniger als 50 % lebensfähig waren.

Mit Hilfe von vier Untersuchungsmethoden (Kernfärbung der toten Zellen mit Trypanblau, Desoxyribonucleinsäuresynthese, Phasenkontrastmikroskopie, Rotfluoreszenz mit Akridinorange) verglich PEGG (83) die Zahl der mit 30 % Glycerin und mit 30 % DMSO behandelten, auf -79°C gefrorenen Knochenmarkszellen. Auch er erhielt bessere Ergebnisse mit DMSO als mit Glycerin.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die entwickelten Methoden die Lebens- und Funktionsfähigkeit der Knochenmarkszellen erhalten und durch einige Verbesserungen noch höhere Überlebensraten ermöglichen können. Der Erfolg von Knochenmarkstransplantationen wird aber durch die immunologischen Reaktionen wesentlich eingeschränkt, die umso stärker auftreten, je besser das Transplantat erhalten ist.

3. ORGANE

a) Nebenniere

Während sich die meisten Versuche auf die Konservierung der Nebennierenrinde - und das mit Erfolg - konzentrierten, haben JOSHI und BLUMENTHAL (44) die Wirkung der Hypothermie auf ganze Rattennebennieren untersucht. Sie tauchten die Organe in 30 %ige Glycerinlösung und gefroren sie auf -10°C , -80°C und -190°C für 24 Stunden. Nach langsamem Auftauen wurden sie homoiotransplantiert. Die Organe zeigten zahlreiche Nekroseherde, die auf die fehlende Blutversorgung zurückzuführen sind und die an Ausmaß bei tiefem Kühlen abnahmen. In den tief gefrorenen Organen war eine verbesserte Regenerationsfähigkeit festzustellen. Das Ausmaß der Empfängerreaktion war ebenfalls reduziert.

b) Nebenschilddrüse

Durch Autotransplantation wird die immunologische Reaktion vermieden. Daher retransplantierten RUSSELL und M. (95) die mit 15 % Glycerin konservierten Nebenschilddrüsen von Ratten. Nach Zwei-Stufen-Kühlung auf -79°C und Lagerung bis zu 78 Tagen brachten 74 % der Drüsen in 5 Tagen das Serum-Ca auf normale Werte. Nach längerer Aufbewahrung erreichten die Organe keine normale Funktion. Nach ultraschnellem Gefrieren auf -195°C und Lagerung von 21 Tagen zeigten 50 % der Nebenschilddrüsen eine schwache und verzögerte Aktivität. Nach längerem Aufbewahren versagten alle Organe.

Langsames, stufenweises Gefrieren und Konservieren bei -79°C und -195°C bis zu 78 Tagen bewirken eine ausgezeichnete Erhaltung der Funktion wie auch der histologischen Struktur.

c) Schilddrüse

15 % oder 20 % Glycerin genügen, die Schilddrüse vor den Schäden beim Gefrieren auf -79°C zu schützen (106). 10 % DMSO in physiologischer Salzlösung sind ebenfalls zum Schutz ausreichend, wenn die Organe stufenweise auf -196°C gefroren werden. Nach 2 Wochen Lagerung wurden Schilddrüsen schnell aufgetaut und in kraniektomierte Hunde autotransplantiert. Es ergaben sich Überlebenszeiten von 6 und 12 Wochen im Vergleich zu 2 Monaten bei kraniektomierten Hunden mit frischen Thyreoideatransplantaten (100).

Die Konservierung der Schilddrüse sowohl mit Glycerin als auch mit DMSO ergibt normal aussehende, gut funktionierende Transplantate.

d) Ovar

Die Tiefkühlkonservierung hat sich auch an Ovarien gut bewährt. 10 Tage lang tiefgekühlte Eierstöcke wurden in die Bauchdecken kastrierter Ratten verpflanzt. 7 - 9 Tage nach Implantation trat der Östrus ein. Die sich gleichmäßig wiederholenden Östruszyklen unterschieden sich nicht von denen bei Ratten mit frisch implantierten Ovarien. Bei der histologischen Untersuchung ergaben sich keine Abnormitäten. Die Kernfärbung war gut (50).

Dieselben günstigen Ergebnisse zeigten sich bei 1, 2 und 10 Tage lang tiefgekühlten Hoden, Kalbshypophysen und Rinderepithelkörperchen.

e) Herz

Die Konservierung des Herzens wirft zahlreiche Probleme auf. Dieses Organ besteht zwar nur aus einer einzigen Gewebsart, nämlich Muskulatur, doch ist es nötig, außer dem Muskelgewebe auch Struktur und Funktion der Gefäße zu erhalten. Da das Herz eine hohe Stoffwechselaktivität zeigt, ist es besonders empfindlich gegen Ischämie und Anoxie.

Auf die mechanische Gefrierpunktserniedrigung durch Dehydratation und hydrostatischen Druck, die das Gefrieren des Organs vermeidet, wurde schon eingegangen. Auch durch Perfusion mit chemischen Substanzen kann der Gefrierpunkt erniedrigt werden. ROBERTSON und M. (92) durchströmten Hundeherzen mit Dimethylsulfoxyd und Dimethylsulfon. In optimaler Konzentration von 15 % g/ml DMSO und 15 % g/ml Dimethylsulfon im Verhältnis 1:3 gemischt, bewirkten sie die Unterkühlung der Organe auf -7°C . Zwei Herzen zeigten nach 28 und 30 1/2 Stunden Lagerung während 3 und 4 Stunden eine normale Aktivität.

Kaninchenherzen tolerieren eine Temperaturerniedrigung bis zu 4°C und zeigen nach Erwärmung normale rhythmische Aktionen. Bei tieferer Kühlung muß ein Gefrierschutzmittel gegeben werden. CONNAUGHTON und LEWIS (22)

fanden, daß Glycerin in der von ihnen genommenen Konzentration von 10 % nicht schützt. Auch Chloroform erwies sich als nicht ausreichendes Gefrierschutzmittel, obwohl sich ein Herz, das auf -20°C gefroren wurde, für 30 Minuten erholte.

ANDJUS und M. (3, 4) untersuchten DMSO und Glycerin an isolierten Rattenfoeten- und Froschherzen. Wie FARRANT (28) erkannten sie den Vorteil des Ca-freien Mediums. Die Wiederherstellung von 75 % der Rattenherzen nach Gefrieren auf -196°C wurde durch 20 % DMSO in einem Ca-freien Medium erreicht, von 37 % durch 20 % DMSO in einem Ca-isotonischen Medium. Bei Anwendung von 30 % Glycerin erholten sich nur 14 %. Dagegen erwies sich Glycerin beim Kühlen von Froschherzen auf -196°C als vorteilhafter. Beim Gefrieren von Rattenfoetenherzen auf -20°C waren beide Schutzmittel gleich wirksam. Dabei war es gleichgültig, ob sich die Herzen in einem Ca-freien oder Ca-haltigen Medium befanden.

Perfusionsversuche mit Glycerinlösung am Hamsterherz zeigten, daß die Glycerinkonzentration nur innerhalb von Stunden bei abnehmender Temperatur erhöht und ebenso langsam nach dem Auftauen verringert werden darf. Wenn das Herz nicht tiefer als -20°C gekühlt worden ist, beginnt es wieder zu schlagen. DMSO kann im Perfusat schnell auf 12 % oder 15 % konzentriert und auch schnell ohne Schaden reduziert werden. Die niedrigste Temperatur, bei der die mit DMSO behandelten Herzen überleben, ist -10°C (107).

Faßt man die Ergebnisse all dieser Versuche zusammen, so zeigt sich, daß sich die Kältekonservierung des Herzens erst im Anfangsstadium befindet. Die Unterkühlung hat zwar einige Erfolge gebracht, doch scheint diese Methode für eine Langzeitkonservierung nicht geeignet zu sein. Das Verfahren der Tiefkühlung und ihre Schutzmaßnahmen bedürfen noch intensiver Untersuchungen, um allgemein angewendet werden zu können.

f) Niere

Die erfolgreiche Nierentransplantation, die bei terminaler chronischer Urämie lebensrettend sein kann, setzt die optimale Konservierung des Organs voraus. Dieses morphologisch und funktionell hoch differenzierte Organ stellt besondere Anforderungen an die Konservierungsmethoden und -mittel.

Um die Stoffwechselaktivität auf ein Minimum zu beschränken, wurden Versuche unternommen, die Nieren schnell und tief zu gefrieren (9, 42, 98, 124). Trotz der verwandten Gefrierschutzmittel zeigten die Organe zum Teil schwere autolytische Veränderungen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Nephronteile gegenüber den Gefrierschäden war verschieden. Es scheint, daß, je höher die Zelle entwickelt und differenziert ist, sie umso leichter geschädigt wird und

ihre Regenerationsfähigkeit umso geringer ist (9). Die Funktion der Nieren fiel entweder ganz aus (124) oder trat nur vorübergehend auf (98, 42). Wegen der in vitro wie auch in vivo schlechten Versuchsergebnisse scheidet die Gefrierkonservierung der Niere aus. Mit den uns bekannten Mitteln ist eine Vermeidung der schweren degenerativen Gefrierschäden nicht möglich.

Die zweite Möglichkeit, Nieren aufzubewahren, ist die Kühlkonservierung oberhalb des Nullpunktes. Schon 1959 autotransplantierten SCHLOERB und M. (97) auf 5° C gekühlte Hundenieren und kühlten isolierte Nieren in situ. Nach einer Nierenischämie bei in-situ-Kühlung bis zu 8 Stunden erholten sich die Tiere vollständig. Nach Transplantation von Nieren, die 12 Stunden ischämisch waren, kam es zu Urämie, da die Organe ausgedehnte hämorrhagische Infarkte zeigten. Die Autotransplantate ergaben nach einstündiger Kühlung ein weitgehend normales histologisches Bild. Nach längerer Kühlung wiesen sie Hyalinisierung und pyelonephritische Herde auf.

Schon nach zwei Stunden hypothermer Ischämie sind cytologische Veränderungen sichtbar: Verschwinden des Bürstensaums der Tubuli, hyalin-granuläre Degeneration der Tubuluszellen, undeutliche Zellkonturen und ödematöse Schwellungen der Tubuli (48). Die Glomerula bleiben weitgehend normal. Diese Veränderungen sind bis zu einem bestimmten Grad, der eine normale Nierenfunktion wieder zuläßt, reversibel.

Durch Perfusion mit entsprechenden Flüssigkeiten versucht man, eine gleichmäßige und rasche Kühlung der Niere und damit geringere Schädigungen zu erreichen. Bei hypothermer Perfusion zeigt sich eine reversible Vasokonstriktion mit Widerstandserhöhung (20, 23, 47, 98, 118). Da diese auch am denervierten Präparat auftritt, sind neural-reflektorische Vorgänge ausgeschaltet. Bei Blutersatzmitteln ist die Vasokonstriktion geringer. SCHMIDT-MENDE (98) konnte bei Kühlung des Nierenarterienblutes eine Substanz im Venenblut nachweisen, die eine pressorische Wirkung am Meerschweinchendarm zeigte. Zur Verbesserung der hypothermen Nierendurchströmung sollten Vasodilatoren zum Perfusat gegeben werden.

Als Perfusate sind Rheomacrodex (23, 47, 48, 49, 68), heparinisiertes Plasma (23, 68) unter Zusatz von Heparin, Papaverin und Procain verwandt worden. MARCHIORO und M. (67) benutzten Ringerlösung mit Laktat und Procainchlorid, und DESHPANDE und JACOB (24) verwandten DMSO-Ringerlösung mit Penicillin und Procain. Doch haben Versuche gezeigt, daß sowohl Glycerin (27, 98) als auch DMSO (98) eine toxische Wirkung auf die Niere haben. Untersuchungen ergaben, daß Rheomacrodex kein optimales Perfusionsmittel ist und Nierenschwellungen mit nachfolgenden Durchblutungsstörungen bewirkt (49, 98).

Für das Überleben, die Erhaltung der Funktion und der histologischen Struk-

tur ist die Kühlrate noch entscheidender als das Perfusat. Langsames Kühlen ($5,5^{\circ}\text{C}/\text{std}$) ist wesentlich schädigender als schnelles ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (49).

Die Wiederbelebungszeit, die bei Versuchen von SCHLOERB und M. (97) maximal 8 Stunden betrug, konnte von SCHMIDT-MENDE (98) auf 16 Stunden verlängert werden. Die Hundenieren wurden vor der Kühlagerung bei 0°C mit einer 0°C kalten physiologischen Kochsalzlösung unter Zusatz von Heparin perfundiert und nach 16 Stunden autotransplantiert. Nach kontralateraler Nephrektomie stieg der Rest-N kurz an, erreichte aber am 5. postoperativen Tag den Ausgangswert. Histologisch zeigten sich normale Glomerula und stellenweise veränderte Tubuluszellen.

CALNE und M. (18) erreichten einen Maximalwert von 12 Stunden bei oberflächengekühlten Hundenieren.

Die von anderen Autoren erhaltenen Wiederbelebungszeiten lagen zwischen 6 und 9 Stunden (47, 48, 67).

Äußerst hohe Wiederbelebungszeiten erhielten HITCHCOCK und M. (36) bei Paviannieren. Die mit Dextran, Heparin und Procain durchspülten Nieren wurden 4 - 22 1/2 Stunden bei 4° - 10°C aufbewahrt und autotransplantiert. Sechs der zwölf Tiere überlebten 1 1/2 bis 3 Jahre und hatten eine normale Blutchemie und Urinausscheidung. Bei 4 Pavianen entwickelte sich eine Hypertonie. Die histologische Untersuchung ergab keine bedeutende Nephrosklerose. Elektronenmikroskopisch zeigten sich leichte Schwellungen der Zellen im inneren Blatt der Bowmanschen Kapsel.

Die geringen immunologischen Reaktionen bei Homoiotransplantation wiesen auf die Möglichkeit einer Heterotransplantation im Menschen hin. Elektrophoretische Untersuchungen zeigten die große Protein-Kompatibilität zwischen Menschen- und Pavianserum.

So wurde im Februar 1963 einer 65-jährigen Frau mit terminaler Urämie eine Pavianniere in den Oberschenkel implantiert. Schon in den ersten 24 Stunden zeigte sich eine gute Nierenfunktion mit Senkung des Rest-N und des Kreatinins. Am 4. postoperativen Tag kam es zu gastrointestinalen Blutungen und infolge einer Thrombose der Nierenarterie zur Anurie. Die Patientin starb am 15. Tag nach der Transplantation. Die histologische Untersuchung ergab zu diesem frühen Zeitpunkt nur eine geringe Zellinfiltration der Niere.

DEMPSTER und M. (23) entfernten mit den Nieren die Ureter, Teile der Aorta und Vena cava als Gewebekblock, der nach Perfusion der Nieren auf 4°C gekühlt wurde. Nach dem Auftauen wurden die Nieren freigelegt und transplantiert. Wichtig war das stufenweise Öffnen der Blutgefäße und Freigeben des Blutstromes über einen Zeitraum von 10 Minuten.

Da während der Kühlung Gefäßspasmen auftreten, führt die schnelle Freigabe des Blutstromes bei Wiederdurchblutung zur Überlastung der extramedullä-

ren Gefäße und zur Stase des medullären Blutstromes infolge des anhaltenden Spasmus. Der zunehmende Druck bewirkt Zerreißen der Gefäße, Hämorrhagie und nachfolgende medulläre Nekrose. Durch Perfusion mit Plasma bei 37° C vor der Anastomosierung und langsamer Freigabe des Blutstromes kann die Hämorrhagie verhindert werden.

Das Verfahren von DEMPSTER und M. (23) wurde in einem klinischen Fall angewandt. Nach Transplantation einer Leichenniere, die 5 Stunden ischämisch gewesen war, setzte die Diurese erst am 9. postoperativen Tag ein. Immunologische Reaktionen führten zur Abstoßung der Niere, die nur minimale Tubulus-schäden und fibrinöse Nekrosen der Gefäße aufwies.

Die Unterdrückung der immunologischen Abwehr ist ebenso wichtig wie die gute Konservierung des Transplantats. Die Empfängerreaktion äußert sich lokal in lympho- und plasmocytärer Infiltration und generell in der Erhöhung der Lymphocyten im Blut und in Antikörperbildung. Der Grad der Identität der biologischen und chemischen Eigenschaften zwischen Spender und Empfänger, die durch die genetische Konstitution festgesetzt sind, bestimmen das Ausmaß der Reaktion (12, 55). Untersuchungen haben ergeben, daß tiefes Gefrieren und Gefriertrocknen eine Unterdrückung bzw. Einschränkung der immunologischen Reaktion bewirken (9, 44, 76).

MORGAN und M. (76) vermuten, daß durch Änderung der Proteinstruktur das Gewebe in einen genetisch neutralen Zustand gebracht wird.

Da für die Nierenkonservierung das Tiefgefrieren und Gefriertrocknen aus-scheiden, hat man versucht, Ganzkörperbestrahlungen und zusätzliche Bestrahlung von Milz, Thymus, Transplantationsgegend und Transplantat oder Einzelbestrahlung des Transplantats anzuwenden (78, 86). Wegen der zahlreichen Nebenwirkungen wird jetzt nur noch eine immunopressorische Therapie mit Prednison, Imuran und Actinomycin C (14, 17, 72, 78, 86) durchgeführt, die nach erfolgreicher Transplantation fortgesetzt werden muß.

Auf Grund der relativ guten Erfolge bei Nierentransplantationen an Versuchstieren wurden Transplantationen am Menschen ausgeführt. Man verwandte in den meisten Fällen aseptisch entnommene Leichenorgane. Diese wurden mit Ringerlösung und Humanalbumin (16, 20) oder mit Rheomacrodex (14, 26) unter Zugabe von Heparin perfundiert, bei 1° C, 4° C oder 10° C bis zur Anastomosierung aufbewahrt und in die Fossa iliaca implantiert. Die Spender sollten bis zum Tod normoton sein und keine Krankheiten des Harntraktes haben. Weiter wurde eine Übereinstimmung im ABO-System gefordert.

Nach anfänglicher An- oder Oligurie verbesserte sich die Nierenfunktion in allen Fällen. CALNE und M. (17) berichten über 5 Fälle, von denen 4 starben. Die Ischämie betrug 78 - 150 Minuten. Es wurde nur eine Oberflächenkühlung durchgeführt. MERRILL und M. (72) erreichten bei einem Patienten, der

noch 15 Monate nach der Transplantation lebt, eine stabile, subnormale Nierenfunktion mit erhöhtem Rest-N. Die übertragene Niere war 40 Minuten ischämisch. Gute Erfolge erzielten BROSIG und NAGEL (14) bei zwei von fünf Patienten, die 6 und 8 Monate post op. leben. CLEVELAND und M. (20) berichten von drei Patienten, die noch nach neun, dreizehn und sechzehn Monaten leben. Ein vierter starb nach 10 Monaten an einer Knochenmarksaplasie. Trotz einer Anoxiedauer von 192 min zeigten die Nieren eine normale Funktion. DUNEA und M. (26) verglichen die Funktionsdauer von Leichtentransplantaten mit der von Transplantaten, die von lebenden Spendern erhalten wurden. Bei diesen beträgt sie bis zu 12 Monaten, bei den Leichenorganen bis zu 10 Monaten. 13 der 24 Patienten leben. Die maximale Ischämiezeit war 59 min.

Beim Vergleich der Kühlmethoden, der Perfusate und der Ischämiedauer bei den erfolgreichen Transplantationen läßt sich keine Regel für ein optimales Verfahren aufstellen.

PORTER und M. (86) übertrugen Paviannieren auf sechs Patienten, von denen vier nach 19 bis 49 Tagen starben. Bei den anderen mußte das Hetero- durch ein Homoiotransplantat ersetzt werden. Alle Nieren zeigten schwerste Veränderungen, die hauptsächlich auf die Abwehrreaktion und weniger auf die Konservierung zurückzuführen sind.

Bei einem Überblick über die bisherigen Ergebnisse zeigt sich, daß die Kühlkonservierung der Niere bis zu einer bestimmten Grenze möglich und erfolgreich ist. Die klinische Anwendung jedoch wird durch die immunologischen Komplikationen erheblich erschwert.

g) Leber

Zur Konservierung dieses wichtigsten Stoffwechselorgans sind bisher wenig Versuche unternommen worden. MARCHIORO und M. (67) perfundierten Hundeleber 71 - 416 min mit laktierter Ringer-Lösung unter Zusatz von Procainchlorid und transplantierten sie in hepatektomierte Tiere. 50 % der Hunde überlebten 1-5 Tage. Der akute Anstieg von SGOT und Bilirubin weist auf schwere Parenchymschäden in Form von centrilobären Nekrosen hin.

4. DISKUSSION

Die Hypothermie bewirkt in den einzelnen Geweben und Organen in Art und Stärke unterschiedliche Reaktionen. Größe, Struktur, Dichte und Funktion der Gewebe sind für die erfolgreiche Konservierung entscheidend. Zellsuspensionen wie Blut und Sperma stellen nicht die Anforderungen an die Konservierungsmethoden und -mittel wie hoch differenzierte Organe. Einheitliche Gewe-

be wie Muskulatur oder Tumoren können leichter konserviert werden als komplexe Organe mit verschiedenen Gewebsanteilen wie die Niere.

Die erfolgreiche Konservierung von Erythrocyten, Leukocyten und Blutplättchen bei tiefen Temperaturen und ihre fast vollständige Wiederherstellung konnte in vitro und in vivo bestätigt werden. Die verschiedenen Verfahren in bezug auf Kühl- und Auftaurate, Lagertemperatur und Schutzmittel ergaben gleiche Ergebnisse. Die von VALERI und HENDERSON (120) und O'BRIEN (79) beobachteten Komplikationen nach Infusion von Erythrocyten-Albumin-Suspensionen und ihre Ursache müssen noch näher untersucht werden.

Gefriergetrocknetes Blut und Blutplasma haben den großen Vorteil, daß sie leicht aufbewahrt und transportiert und im Notfall schnell aufgefüllt werden können. Die in vivo Ergebnisse kommen denen der gefrorenen Präparate gleich.

Bei gefriergetrockneten Bullenspermien ergab sich eine Überlebensrate von 40 - 50 % (75). Über die Fruchtbarkeitsquote konnten auf Grund der wenigen Versuche keine Angaben gemacht werden und keine Vergleiche zu gefrorenem Samen gezogen werden. Ein Nachteil besteht in der geringen Stabilität während der Lagerung bei Zimmertemperatur. Da das getrocknete Material sehr hygroskopisch ist, kann sich die Restfeuchtigkeit leicht erhöhen und damit die Eiweißkomponenten verändern. Tiefgefrorener Samen kann jahrelang ohne großen Verlust der Fruchtbarkeit aufbewahrt werden.

Die Konservierung von bradytrophem Gewebe wie Arterien, Knochen, Knorpel, Nerven, Sehnen, Cornea, von Knochenmark und Haut kann sowohl durch Tiefkühlung als auch durch Gefriertrocknen erfolgen. Cornea, Haut und Knochenmark werden gewöhnlich in lebensfähigem Zustand aufbewahrt. Da Knochen, Knorpel, Arterien, Sehnen und Nerven vorwiegend eine mechanische Funktion haben, ist es vorteilhaft, sie durch schnelles Gefrieren auf -78°C ohne Schutzmittel oder maximales Gefriertrocknen abzutöten. Dadurch werden die immunologischen Reaktionen, die noch nicht vollständig unterdrückt werden können, vermieden. Die gefriergetrockneten Gewebe sind hart, werden aber beim Rehydrieren elastisch und weich. Die Rehydrierung vollzieht sich in Geweben mit niedrigem Lipidgehalt wie Arterien, Haut und Sehnen relativ schnell (15 - 30 min), in Knochen und Nerven dagegen relativ langsam (5).

Knochen, Arterien und Nerven können auch in lebensfähigem Zustand erfolgreich bei tiefen Temperaturen aufbewahrt werden.

Die Konservierung von Muskulatur ist noch nicht möglich, da die bekannten Gefrierschutzmittel das Gewebe nur unvollständig schützen. Das Mißverhältnis des Calciums zu Natrium und Kalium weist auf die Zellmembran als Sitz der Schädigung hin. Genaue Untersuchungen darüber sind erforderlich.

Die Kältekonservierung von Nebennieren - im Gegensatz zur isolierten Nebennierenrinde - ist bisher nicht erfolgreich, obwohl mit abnehmender Tem-

peratur die Degenerationserscheinungen geringer werden. Bessere Ergebnisse zeigen sich bei der Schilddrüse und Nebenschilddrüse. Die Organe haben normale Struktur und Funktion, wenn die Lagerzeit eine bestimmte Grenze nicht überschreitet. Andere endokrine Organe wie Ovar, Hoden, Hypophyse und Epithelkörperchen können ebenfalls mit Erfolg durch Hypothermie konserviert werden. Durch die Tiefkühlung bleibt auch die Sterilität der aseptisch entnommenen Organe erhalten.

Die Konservierung dieser Organe ist wesentlich einfacher als die des Herzens und der Niere. Die Größe der Organe und die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Gewebsanteile auf Kälte, Anoxie und Schutzmittel erschweren die Erhaltung ihrer Lebens- und Funktionsfähigkeit. Zahlreiche Versuche sind unternommen worden, die optimalen Konservierungs-Bedingungen auszuarbeiten.

Am Herzen wurden zwei Verfahren angewandt: das der Unterkühlung und das des Gefrierens. Durch Dehydratation bis auf 55 % und durch hydrostatischen Druck wurde die Unterkühlung erreicht. Die Herzen zeigten bis zu 12 und 22 Stunden normale Aktionen. Nach Unterkühlung durch Perfusion mit DMSO und Dimethylsulfon waren sie maximal vier Stunden funktionsfähig. Wegen der geringen Stabilität im unterkühlten Zustand scheidet diese Methode für eine Langzeitkonservierung aus.

Beim Gefrieren auf -196°C und auf -20°C variierten die Schutzmittel DMSO und Glycerin und das Medium in bezug auf Calcium. Wie in der Muskulatur sind auch hier die Bedeutung des Calciums im Gefrierprozeß und die Wirkungsmechanismen der Schutzmittel ungeklärt. Bevor diese nicht erkannt werden, ist die Entwicklung einer optimalen Konservierungsmethode nicht möglich.

Perfusionsversuche zeigten ein unterschiedliches Verhalten des Herzens gegenüber Glycerin und DMSO. Die Glycerinkonzentration muß langsam erhöht werden, während DMSO schnell konzentriert werden kann. Auf die Undurchlässigkeit der Kapillaren für Glycerin und die Durchgängigkeit für DMSO und die dadurch bedingten Flüssigkeitsverschiebungen soll nur hingewiesen werden. Der ursächliche Zusammenhang muß noch geklärt werden.

Die bisherigen Versuche an Herzen haben noch keine erfolgreiche Konservierungsmethode ergeben.

Die Wirkung der Hypothermie auf die Niere ist vielfach untersucht worden. Die Gefrierkonservierung ist wegen der irreversiblen, nicht vermeidbaren Schädigungen ausgeschlossen worden; denn Glycerin und DMSO können wegen ihrer toxischen Wirkung auf die Niere nicht verwendet werden.

Die Kühlkonservierung bis zu 0°C dagegen ist relativ erfolgreich angewandt worden. Noch nach 16 Stunden Kühlagerung kann die Niere nach vorübergehender Dysfunktion normal arbeiten. Von den meisten Autoren wird die

Perfusion als beste Kühlungsmethode angesehen. In vielen Fällen bildet Rheomacrodex das Grundperfusat. Einige nehmen Ringerlösung oder physiologische Kochsalzlösung. Durch Zugabe von Vasodilatoren wird die hypothermische Vasokonstriktion vermieden.

Die stufenweise Freigabe des Blutstromes nach Anastomosierung ist für die Erhaltung der Nierengefäße entscheidend. Nach Rezirkulation kann es zu einer dauernden Erhöhung des Tonus im arteriellen System kommen, bedingt durch den verlangsamten Blutstrom im venösen Anteil. Die Ursache dafür sind Ödeme und "sludging" (23). Durch intraarterielle Infusionen unter Zugabe von Vasodilatoren kann die Steigerung des Tonus herabgesetzt werden.

Bei Homoiotransplantation konservierter Nieren führt die immunologische Reaktion, wenn sie nicht unterdrückt wird, zur Zerstörung des Transplantats. Diese Reaktion kann heute schon weitgehend eingeschränkt werden. Damit kann das Transplantat seine normale Funktion aufnehmen.

Die Kältekonservierung der Niere ist unter den jetzigen Bedingungen nur innerhalb eines bestimmten Temperaturbereiches und einer bestimmten Lagerzeit erfolgreich. Unter 0°C und nach mehr als 16 Stunden Aufbewahrung sind die Nieren irreversibel geschädigt und nicht zu normaler Funktion fähig.

VII. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die Konservierung von Geweben und Organen setzt den Stillstand oder wenigstens die maximale Senkung der Stoffwechselaktivität voraus. Versuche über den Sauerstoffverbrauch und die Konzentration der energiereichen Phosphate als Maßstäbe für den Zellstoffwechsel in Abhängigkeit von der Temperatur haben eine exponentielle Erniedrigung des Stoffwechsels mit sinkender Temperatur gezeigt. Daraus ergibt sich die Hypothermie als Möglichkeit der Organ- und Gewebekonservierung.

Bei der Temperaturniedrigung unter 0°C kommt es neben der Reduktion der physikalischen und chemischen Vorgänge zum Phasenwechsel. Die Eiskristallbildung, die entsprechend der Kühlrate vorwiegend extra- oder auch intrazellulär eintritt, bewirkt primär - oder sekundär - die Schädigung der Zellen. Das Ausmaß der Schäden ist von Zahl, Größe und Lage der Kristalle und den damit verbundenen physiko-chemischen Veränderungen abhängig.

Um irreversible Schäden zu vermeiden, muß die Kristallisation eingeschränkt werden. Die Verhinderung der Eisbildung ist nur durch Unterkühlung möglich, deren Grenze für Wasser bei -39°C liegt. Die mechanische Unterkühlung durch Dehydratation und durch äußeren Druck ist bisher nur auf das Herz angewandt worden. Die Organe konnten bis auf -9°C (7) und -20°C (43) unterkühlt werden. Die Unterkühlung durch Perfusion mit chemischen Substanzen wurde auch am Herzen untersucht (92) und war in begrenztem Maße erfolgreich. Doch wegen des großen apparativen Aufwandes ist dieses Verfahren praktisch nicht durchführbar.

Ultraschnelles Kühlen kann die Kristallisation zwar nicht vermeiden - selbst bei der Vitrifikation werden Mikrokristalle gebildet -, es kann sie aber einschränken. Leider ist diese Methode nicht auf Gewebe und Organe anwendbar.

Die Einschränkung der Eisbildung kann auch durch Gefrierschutzmittel erfolgen. Ausgezeichneten Gefrierschutz geben einige Alkohole, Amide und andere chemische Substanzen, die wenig toxisch sind und ein gutes Wasserbindungs- und Permeationsvermögen haben. Die wirksamsten sind Glycerin und Dimethylsulfoxyd. Sie schützen viele Gewebe und sind nur für die Niere toxisch. Die Anwendung von Makromolekülen wie Dextran, PVP und Polyäthylenglykol hat sich bei der Konservierung von Blutzellen und Knochenmarkszellen erfolgreich erwiesen. Dextran wird häufig als Grundperfusat bei der Nierendurchströmung verwendet. Es hat sich jedoch gezeigt, daß dadurch Nierenschwellungen mit Kapselspannung hervorgerufen werden (98).

Die Kühlungs- und Erwärmungsmethoden sind noch nicht vollständig entwickelt, doch reichen die Oberflächenkühlung bzw. -erwärmung und die Perfu-

sionsmethode in den meisten Fällen aus. Der Vorteil der Perfusion von Organen vor dem Eintauchen in ein Kühlbad ist das homogene und rasche Kühlen. Sie wird daher fast ausschließlich bei der Niere verwendet.

Die Kältekonservierung wird bei Zellen und Geweben durchaus erfolgreich durchgeführt. Gefrorenes und aufgetautes Blut unterscheidet sich nicht von frischem. Spermien können jahrelang aufbewahrt werden, sowohl in gefrorenem als auch in gefriergetrocknetem Zustand.

Die Methode des Gefriertrocknens hat sich besonders bei der Konservierung bradytropher Gewebe bewährt. Die Erfolge bei abgetöteten Geweben sind ebenso groß wie die bei gefrorenen lebensfähigen Transplantaten. Das Tiefgefrieren ermöglicht die gute Erhaltung von Arterien, Nerven, Haut, Cornea und Knochenmark, so daß sie sich nicht von frisch entnommenem Gewebe unterscheiden. Die optimalen Konservierungsbedingungen und -mittel variieren bei jedem Gewebe. Versuche mit Tumoren haben gezeigt, daß die tiefe Hypothermie die Fähigkeit, zu wachsen und zu metastasieren, nicht zerstört.

Die Kältekonservierung endokriner Organe ist bisher begrenzt möglich. Die Organe können, ohne irreversibel geschädigt zu werden, nur eine bestimmte Zeit hypothermisch gelagert werden. Bei der Nebenschilddrüse liegt diese Grenze bei 78 Tagen (95). Die innerhalb dieser Zeit aufbewahrten Organe zeigen nach dem Auftauen eine normale Funktion.

Versuche mit Rattenfoeten-, Frosch- und Hamsterherzen zeigten zwar einige Erfolge, doch konnte noch keine optimale Konservierungsmethode für das Herz entwickelt werden.

Dagegen waren Versuche, Nieren in Hypothermie über 0°C zu konservieren, erfolgreich, wenn die Wiederbelebenszeit von 16 Stunden (98) und 22 1/2 Stunden (36) nicht überschritten wurde. Autotransplantierte Nieren zeigten eine normale Funktion bis zu 3 1/2 Jahren (36). Nach der heute möglichen Einschränkung der immunologischen Reaktion konnten konservierte Nieren in Versuchstiere und Menschen homoiotransplantiert werden und normal funktionieren. Die Erfolge waren nicht in allen Fällen gleich. Beim Menschen zeigten sich Überlebenszeiten bis zu 16 Monaten. Einige Patienten leben noch.

Wenn auch die Nierentransplantation heute noch als eine rein palliative Maßnahme zu werten ist, so besteht doch die Aussicht, daß bei weiterer Forschung ein optimales Kühlkonservierungsverfahren ausgearbeitet wird, das sowohl die Struktur als auch die Funktion des Organs vollständig erhält. Doch ist es nicht möglich, bei diesen relativ hohen Temperaturen die Niere langfristig aufzubewahren. Der Zellstoffwechsel läuft, wenn auch verlangsamt, weiter ab, und es kann zu dysregulatorischen Vorgängen kommen. Bei der tiefen Hypothermie dagegen werden die enzymatischen Vorgänge weitgehend abgebremsst. Doch besteht mit den uns heute bekannten Mitteln nicht die Möglichkeit, die Niere

bei tiefen Temperaturen unter dem Nullpunkt zu konservieren, da die Gefrierschäden noch nicht verhindert werden können. Nur wenn ein wirksames, für die Niere nicht toxisches Gefrierschutzmittel oder eine andere Methode, die Kristallisation zu vermeiden bzw. einzuschränken, gefunden wird, kann die Gefrierkonservierung durchgeführt werden.

Die Konservierung anderer Organe wie Herz, Leber und Lunge zeigt ebenso viele Schwierigkeiten, die mit den heutigen Mitteln und Methoden nicht beseitigt werden können. Inwieweit eine Aufbewahrung all dieser Organe möglich ist, läßt sich noch nicht sagen. Weitere Untersuchungen werden die Möglichkeit oder Unmöglichkeit einer Kältekonservierung zeigen.

Entscheidend für den Erfolg einer Transplantation ist nicht nur die Erhaltung des Organs, sondern auch die immunologische Reaktion des Empfängers. Solange diese noch nicht vollständig unterdrückt werden kann, bleibt die Transplantation von Geweben und Organen nur eine palliative Maßnahme. Es kommt nicht zur vollständigen Heilung des Patienten.

Die bisherigen Erfolge in der Kältekonservierung haben ein Ziel gezeigt: die Einrichtung von Gewebe- und Organbanken. Dieses Ziel ist zum Teil erreicht. Blut- und Samenbanken bestehen schon seit langer Zeit und haben sich gut bewährt. Auch Gewebe wie Knochen, Knorpel, Arterien, Nerven, Cornea und Knochenmark werden in Banken aufbewahrt und stehen dem Chirurgen jederzeit zur Verfügung. Dagegen ist die langzeitige Konservierung von Organen noch nicht möglich. Obwohl die endokrinen Organe wesentlich länger gelagert werden können als die Niere, ist ihre Wiederbelebenszeit noch begrenzt. Sie ist allerdings so groß, daß sie dem Chirurgen eine gewisse zeitliche Unabhängigkeit von Entnahme und Transplantation gibt.

Um das ferne Ziel, die Errichtung von Organbanken, zu erreichen, sind noch zahlreiche Versuche notwendig, die die Grenzen und Möglichkeiten der Kältekonservierung näher aufzeichnen und, wenn sie erfolgreich sind, einen wesentlichen Fortschritt in der Medizin bedeuten.

Herrn Priv.-Doz.-Dr. M. SCHMIDT-MENDE danke ich
freundlichst für die Themastellung, für das Interesse,
das er meiner Arbeit entgegenbrachte, und für Rat und
Förderung, die er mir gewährte.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. R. ZENKER danke ich für
die Übernahme des Korreferates.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDJUS, R. K. Les limites de résistance de l'organisme animal aux basses températures: des banques de tissus à la bioastronautique. Aspects théor. et industr. de la lyophil. Hermann, Paris, 451, 1964
2. ANDJUS, R. K., J. E. LOVELOCK
Reanimation of rats from body temperatures between 0° and 1° C by microwave diathermy. J. Physiol., 128: 541, 1955
3. ANDJUS, R. K., V. RAJEVSKI, M. PAVLOVIC-HOURNAC
Reanimation of frozen hearts; effect of calcium and of chemical protectors (glycerol and dimethyl sulfoxide). Bull. Inst. Intern. Froid, 43, 1961
4. ANDJUS, R. K., V. RAJEVSKI, M. PAVLOVIC-HOURNAC
Réanimation et transplantation du coeur foetal de rat après congélation. J. de Physiol., 54, 2: 272, 1962
5. ANDREW, C., L. BASSETT
Tissue banks. Aspects théor. et industr. de la lyophil. Hermann, Paris, 431, 1964
6. ASHWOOD-SMITH, M. J.
Viability of mouse bone marrow frozen to -79° C in the presence of dimethyl sulfoxide. J. Physiol., London, 155: 26, 1960
7. BARSAMIAN, E. M., St. W. JACOB, S. C. COLLINS, O. E. OWEN
Preliminary studies on the transplantation of supercooled hearts. Transpl. Bull., 1: 405, January 1960
8. BECKETT, L. G.
The effects of residual moisture in frozen-dried materials, and its measurement. In: Biol. Appl. of Freez. a. Drying. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 285, 1954
9. BELTRAN, J. C., H. T. BLUMENTHAL
Effects of dehydration-freezing-thawing on the preservation and homotransplantability of renal tissue. J. Urol., 82, 4: 424, October 1959

10. BERGSTRAND, A., G. STERKY
Renal function in hypothermia. *Acta physiol. scand.*, 31: 13, 1954
11. BILLINGHAM, R.E.
The preservation of tissues. In: *Biol. Appl. of Freez. a. Drying*. Ed. by R.J.C. Harris, N.Y. Acad. Press, 253, 1954
12. BILLINGHAM, R.E., L. BRENT, F.B. MEDAWAR
The antigenic stimulus in transplantation immunity. *Nature*, 178: 514, 1956
13. BLOOM, M.L., E. WITEBSKY, T. BOW, R.F. DWYER, C. BULL
Survival in man of frozen blood. *Proc. 9 th Cong. Int. Soc. Blood Transf.*, Mexico City, S. Karger, Basel, 1962
14. BROSIG, W., R. NAGEL
Klinische Probleme der Nierentransplantation beim Menschen. *Der Urologe*, 4, 1: 1, Januar 1965
15. BROWEN, V.K., J. ROBINSON, D.E. STEVENSON
A note on the toxicity and solvent properties of dimethyl sulfoxide. *J. Pharm. and Pharmacol.*, 15: 688, 1963
16. CALNE, R.Y.
Technical aspects of cadaveric renal transplantation. *Brit. J. of Urol.*, 37, 3: 285, June 1965
17. CALNE, R.Y., L.W. LOUGHRIDGE, J.B. Mac GILLIVRAY, J.F. ZILVA, A.J. LEVI
Renal transplantation in man (a report of five cases, using cadaveric donors). *Brit. Med. J.*, 645, Sept. 1963
18. CALNE, R.Y., D.E. PEGG, J. PRYSE-DAVIES, F.L. BROWN
Renal preservation by ice-cooling. An experimental study relating to kidney transplantation from cadavers. *Brit. Med. J.*, 651, Sept. 1963
19. CAVINS, J.A., St.C. SCHEER, E.D. THOMAS, J.W. FERREBEE
The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80°C . *Blood*, 23, 1: 38, Jan. 1964

20. CLEVELAND, R.J., H.M. LEE, G.R. PROUT, D.M. HUME
 Preservation of the cadaver kidney for renal
 homotransplantation in man. *Surg. Gynec. Obstet.*,
 119: 991, 1964
21. COHEN, P., F.H. GARDNER
 Platelet preservation. I. Preservation of canine
 platelets at 4⁰ C. II. Preservation of canine
 platelet concentrates by freezing in solutions of
 glycerol plasma. *J. of Clin. Invest.*, 41, 1: 10,
 Jan. 1962
22. CONNAUGHTON, P.J., F.J. LEWIS
 Use of glycerol and chloroform in heard preservation
 by freezing. *Surg. Forum*, 12: 177, 1961
23. DEMPSTER, W.C., S.L. KOUNTZ, M. JOVANOVIĆ
 Simple kidney-storage technique. *Brit. Med. J.* 1:
 407, Febr. 1964
24. DESHPANDE, P.J., St. W. JACOB
 Successful storage of kidneys at subzero tempera-
 tures. *Surg. Forum*, 14: 176, 1963
25. DISTEFANO, V., H.H. BORGSTEDT
 Reduction of dimethylsulfoxide to dimethylsulfide
 in the cat. *Science*, 144, 3622: 1137, May 1964
26. DUNEA, G., S. NAKAMOTO, R.A. STRAFFON, J.E. FIGUEROA,
 A.A. VERSACI, M. SHIBAGAKI, W.J. KOLFF
 Renal homotransplantation in 24 patients.
Brit. Med. J., 1: 7, 1965
27. EGDAHL, R.H., R. HARRIS
 In vivo tolerance of canine kidneys to glycerol
 perfusion. *Transpl. Bull.*, 6, 1: 110, 1959
28. FARRANT, J.
 Pharmacological actions and toxicity of dimethyl
 sulfoxide and other compounds with protect smooth
 muscle during freezing and thawing. *J. Pharm.*
 and *Pharmacol.*, 16: 472, 1964

29. FERNÁNDEZ-MORÁN, H. Low temperature preservation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. *Ann. of the N. Y. Acad. of Scienc.*, 85, 2: 689, 1960
30. FLOSDORF, E. W. The development of freeze-drying. In: *Biol. Appl. of Freez. and Drying*. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 63, 1954
31. FRY, R. M. The preservation of bacteria. In: *Biol. Appl. of Freez. and Drying*. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 215, 1954
32. GERSH, I., J. L. STEPHENSON
Freezing and drying of tissues for morphological and histochemical studies. In: *Biol. Appl. of Freez. and Drying*. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 329, 1954
33. GREAVES, R. I. N. Theoretical aspects of drying by vacuum sublimation. In: *Biol. Appl. of Freez. and Drying*. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 87, 1954
34. HARRIS, R. J. C. The preservation of viruses. In: *Biol. Appl. of Freez. and Drying*. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 201, 1954
35. HEARD, B. E. The histological appearances of some normal tissues at low temperatures. *Brit. J. of Surg.*, 42: 430, July 1954 to May 1955
36. HITCHCOCK, C. R., J. C. KISER, R. L. TELANDER, E. L. SELJESKOG
Baboon renal grafts. *J. Amer. Med. Ass.*, 189, 12: 934, Sept. 1964
37. HUFNAGEL, C. A. Experimental and clinical observations on the transplantation of blood vessels. In: *The preservation of normal tissues for transplantation*. Ciba Foundation Symposium. 1953
38. HUGGINS, Ch. E. Dimethyl sulfoxide analysis to facilitate study of whole organ preservation by freezing. *Surg. Forum*, 13: 51, 1962

39. HUGGINS, Ch.E. Frozen blood transfusions: use of dimethyl sulfoxide and its removal after thawing by dilution with reversible agglomeration of the cells. Science, 139: 504, 1963
40. HUGGINS, Ch.E. Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethyl sulfoxide. Transfusion (Philad.), 3: 483, 1963
41. JACOB, St.W., M. BISCHER, R.J. HERSCHLER
Dimethyl sulfoxide: effects on the permeability of biologic membranes. Curr. Therap. Res., 6, 3: 193, 1964
42. JACOB, St.W., T.H. MOGHUL, S.C. COLLINS, J.E. DUNPHY
Experimental studies in cryobiology. Amer. J. of Surg., 102: 254, August 1961
43. JACOB, St.W., R.L. WEBB
An experimental approach to the supercooling of canine hearts, Surg. Forum, 11: 200, 1960
44. JOSHI, R.A., H.T. BLUMENTHAL
Alteration of homotransplantability of rat adrenal and aorta by dehydration freezing. Labor. Invest., 7, 1: 19, 1958
45. JOSLYN, M.A. The action of enzymes in the dried state and in concentrated solution. Proc. 8th Intern. Congr. Refrig., 331, 1951
46. KAROW, A.M., W.R. WEBB
Principles and problems of hypothermic organ preservation. Surg., Gynec. and Obst. and Intern. Abstracts, 119: 609, Sept. 1964
47. KISER, J.C., H.H. FARLEY, G.F. MUELLER, C.J. STROBEL, C.R. HITCHCOCK
Successful renal autografts in the dog after seven hour selective kidney refrigeration. Surg. Forum, 11: 26, 1960

48. KISER, J.C., R.L. TELANDER, T.A. PETERSON, J.I. COE,
C.R. HITCHCOCK
Canine renal autografts. Arch. of Surg.,
83: 34, Oct. 1961
49. KNIGHT, P.R., Z.M. TOMKIEWICZ, N.P. COUCH
Evaluation of functioning canine renal autografts
after six hours storage. Surg. Forum, Clin. Congr.,
14: 171, 1963
50. KUBÁNYI, E.
Theoretische Grundlagen der Tiefkühlung.
Zentralblatt für Chirurgie, 47: 2175, 1958
51. KÜHNNAU, J.
Ernährungsphysiologische Gesichtspunkte bei der
Verwendung von Gefrierprodukten. Wissenschaftl.
Veröffentl. d. Deutschen Gesellschaft für Ernährung, 12: 1, 1964
52. LEHR, H.B., A.L. SUMMERS, P.A. LOTKE, R.B. BERGGREN,
R.W. HAMILTON
Dielectric heating for thawing of large organs.
Surg. Forum. 14: 476, 1963
53. LEVITT, J.
Freezing injury of plant tissue. Ann. of the N.Y.
Acad. of Scienc., 85, 2: 570, 1960
54. LEVY, M.M.
Oxygen consumption and blood flow in the
hypothermic perfused kidney. Amer. J. Physiol.,
197: 1111, 1959
55. LOEB, L.
The biological basis of individuality.
Springfield, III, Thomas, 1945
56. LOVELOCK, J.E.
The haemolysis of human red blood - cells by
freezing and thawing. Biochim. et Biophys.
Acta, 10: 414, 1953
57. LOVELOCK, J.E.
The mechanism of the protective action of
glycerol against haemolysis by freezing and
thawing. Biochim. et Biophys. Acta, 11:
28, 1953

58. LOVELOCK, J.E. Biophysical aspects of the freezing of living cells. In: The preservation of normal tissues for transplant. Ciba Foundation Symp. In press, 1953. Zit. nach: A.U. Smith. Effects of low temp. Biol. Appl. of Freezing a. Drying, 1, 1954
59. LOVELOCK, J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochem. J., 56: 265, 1954
60. LOVELOCK, J.E. Haemolysis by thermal shock. Brit. J. Haematol., 1: 117, 1955
61. LOVELOCK, J.E., M.W.H. BISHOP Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. Nature, 183, 4672: 1394, May 1959
62. LUSENA, C.V. Ice propagation in glycerol solutions at temperatures below -40° C. Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 541, 1960
63. LUYET, B.J. Vitrification of water, Physiol. Revs., 56: 1244, 1939
64. LUYET, B.J. The vitreous state of matter and the devitrification temperatures. In: Temperature: Its Measurement and Control in Science and Industry. Amer. Institute of Physics. Reinhold Publish. Corp., N.Y., 420, 1941
65. LUYET, B.J. On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 549, 1960
66. LUYET, B.J., J. KEANE A critical temperature range apparently characterized by sensitivity of bull semen to high freezing velocity. Biodynamica, 7: 281, 1955
67. MARCHIORO, T.L., W.R. WADDELL, Th.E. STARZL Use of extracorporeal cadaver perfusion for preparation of organ homografts. Surg. Gynec. Obstet., 117: 385, 1963

68. MARKLAND, C., F. M. PARSONS
Preservation of kidneys for homotransplantation.
Brit. J. of Urol., 35, 4: 457, 1963
69. MASTENBROEK, G. G. A. The freeze-drying of mother's milk. In: Biol. Appl. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 177, 1954
70. MAZUR, P. Physical factors implicated in the death of microorganismus at subzero temperatures. Ann. of the N. Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 610, 1960
71. MAZUR, P. Manifestations of injury in yeast cells exposed to subzero temperatures. I. Morphological changes in freeze-substituted and in "frozen-thawed" cells. II. Changes in specific gravity and in the concentration and quantity of cell solids. J. Bact., Balt., 82: 662, 1961
72. MERRILL, J. P., J. E. MURRAY, F. J. TAKACS, E. B. HAGER, R. E. WILSON, G. J. DAMMIN
Successful transplantation of kidney from a human cadaver. J. Amer. Med. Ass., 185: 347, 1963
73. MERYMAN, H. T. General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. Ann. of the N. Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 503, 1960
74. MERYMAN, H. T. Principles of freeze-drying. Ann. of the N. Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 630, 1960
75. MERYMAN, H. T. Drying of living mammalian cells. Ann. of the N. Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 729, 1960
76. MORGAN, J. F., L. F. GUERIN, H. J. MORTON
The effect of low temperature and storage on the viability and mouse strain specificity of ascitic tumor cells. Cancer Res., 16: 907, 1956
77. MUELLER, F. O., A. U. SMITH
Preservation of rabbit corneal tissue at -79° C. Exp. Eye Res., 2: 237, 1963

78. NAGEL, R. Der heutige Stand der Nierentransplantation.
Chirurg. 35: 184, 1964
79. O'BRIEN, T.G., L.L. HAYNES, A.C. HERING, J.C. TULLIS,
E. WATKINS
The use of glycerolized frozen blood in vascular
surgery and extracorporeal circulation.
Surgery, 49, 1: 109, 1961
80. PARTMANN, W. Aktivierung der ATP-Spaltung im Warm- und
Kaltblütermuskel durch Gefrieren und mechanische
Verletzung. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, 2: 70, 1961
81. PARTMANN, W. Physikalische und biochemische Veränderungen
von Lebensmitteln beim Gefrieren und bei der
Gefrierlagerung. Wissenschaftl. Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft f. Ernährung,
12: 12, 1964
82. PARTMANN, W., G. NEMITZ
Eiweißveränderungen in gefriergetrockneter
Muskulatur. Zeitschr. f. Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 120, 3: 190, 1963
83. PEGG, D.E. In vitro assessment of cell viability in human
bone marrow preserved at -79°C . J. of Appl. Physiol., 19, 1: 123, 1964
84. PHILLIPS, P.H., H.A. LARDY
A yolk-buffer pabulum for the preservation of
bull semen. J. Dairy Sci., 23: 399, 1940
85. POLGE, C., A.U. SMITH, A.S. PARKES
Revival of spermatozoa after vitrification and
dehydration at low temperatures. Nature, 164,
4172: 666, Oct. 1949
86. PORTER, K.A., T.L. MARCHIORO, T.E. STARZL
Pathological changes in six treated baboon-to-
man renal heterotransplants. Brit. J. of Urol.,
37, 3: 274, June 1965

87. RAPATZ, G., B. LUYET The problem of the effect of intracellular ice on hemolysis. *Biodynamica*, 8: 295, 1961
88. REY, L.R. Thermal analysis of eutectics in freezing solutions. *Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc.*, 85, 2: 510, 1960
89. RINFRET, A.P. Factors affecting the erythrocyte during rapid freezing and thawing. *Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc.*, 85, 2: 576, 1960
90. RINFRET, A.P., G.F. DOEBBLER, A.W. ROWE, C.W. COWLY, R.R. SAKAIDA
 The preservation of blood by rapid freezing and thawing: present status and physical factors involved. *Proc. 11th Int. Congr. Refrig.*, 1963
91. RIVERS jr., R.J., B. CADY, H. BARNER, L.L. HAYNES, E. WATKINS jr.
 Osmotic cell damage during glycerol perfusion of the isolated canine kidney. *Surg. Forum*, 12: 134, 1961
92. ROBERTSON, R.D., P. DESHPANDE, L. SLEGEL, St.W. JACOB
 Studies on the function of the canine heart exposed to sub-zero temperatures. *J. Amer. Med. Ass.*, 187: 574, February 1964
93. ROSTAND, J. Glycérine et la résistance du sperme aux basses températures. *Compt. rend.* 222: 1524, 1946
94. ROWE, T.W.G. The theory and practice of freeze-drying. *Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc.*, 85, 2: 641, 1960
95. RUSSELL, P.S., R.F. GITTES, E.M. SPARROW
 Storage of parathyroid tissue in the frozen state. *Surg. Forum*, 11: 21, 1960
96. SAWADA, Y., M.C. CHANG
 Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertility and Sterility*, 15, 2: 222, 1964

97. SCHLOERB, L. R., R. D. WALDORF, N. S. WELSH
The protective effect of kidney hypothermia on total renal ischämia. Surg. Gynec. Obstet., 561, November 1959
98. SCHMIDT-MENDE, M.
Die Konservierbarkeit der Niere in Hypothermie. Habilitationsschrift, Chirurg, Univ. Klinik München, 1965
99. SCHNEIDER, M.
Über die Wiederbelebung nach Kreislaufunterbrechung. Thoraxchirurgie, 6: 95, 1958.
Zit. nach M. Schmidt-Mende
100. SHORTER, R. G., J. L. TITUS, F. W. L. KERR, J. C. CAMPBELL
Effects of freezing and storage on survival of thyroid autografts. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 113: 73, 1963
101. SHUH- WEI HWANG, E. E. DAVIS, M. T. ALEXANDER
Freezing and viability of tetrahymena pyriformis in dimethyl sulfoxide. Science, 144, 3614: 64, 1964
102. SILVER, R. K., H. B. LEHR, A. SUMMERS, A. E. GREENE, L. I. CORIELL
Use of dielectric heating (shortwave diathermy) in thawing frozen suspensions of tissue culture cells. Proc. of Soc. Exper. Biol. Med., 115: 453, 1964
103. SINGER, J. H.
The freeze-drying of antibiotics. In: Biol. Appl. of Freez. and Drying. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 151, 1954
104. SLOVITER, H. A.
Effects of the intravenous administration of glycerol solutions to animals and man. J. Clin. Invest., 37: 619, 1958
105. SMITH, A. U.
Effects of low temperatures on living cells and tissues. In: Biol. Appl. of Freez. and Drying. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 1, 1954
106. SMITH, A. U.
Biological effects of freezing and supercooling. London, Edw. Arnold Ltd, 1961

107. SMITH, A.U. Some problems in supercooling and freezing living cells, tissues and organisms. Aspects théoriques et industr. de la lyophilisation. Ed. L. Rey. Hermann, Paris, 257, 1964
108. SMITH, A.U., M.J. ASHWOOD-SMITH, M.R. YOUNG
Exp. Eye Res., 2: 71, 1963. Zit. nach A.U. Smith. Some probl. in supercooling and freezing. Aspects théor. et industr. de la lyophil. Ed. L. Rey. Hermann, Paris, 1964
109. SMITH, A.U., C. POLGE, J. SMILES
Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. J. R. Micr. Soc., 71: 186, 1951
110. SMITH, A.U., J. SMILES
Microscopic studies of mammalian tissues during cooling to -79°C . J. R. Micr. Soc., 73: 134, 1953
111. SOMMER, G., G. TAUBERGER
Toxikologische Untersuchungen mit Dimethylsulfoxyd. Arzneimittel-Forschung, 14: 1050, 1964
112. STEPHENSON, J.L. Ice crystal formation in biological materials during rapid freezing. Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 534, 1960
113. STICKEL, D.L., R.J. FLEMMING, C.V. MORGAN jr., W.G. ANLYAN
Temperature control in glycerolized kidneys during freezing and thawing. Surg. Forum, 14: 178, 1963
114. STRUMIA, M.M. The preservation of blood plasma and blood products by freezing and drying. In: Biol. Appl. of Freez. and Drying. Ed. by R.J.C. Harris, N.Y. Acad. Press, 129, 1954
115. TAYLOR, A.C. The physical state transition in the freezing of living cells. Ann. of the N.Y. Acad. of Scienc., 85, 2: 595, 1960
116. THAUER, R., W. BRENDDEL
Hypothermie, Progr. Surg., 2: 73, 1962

117. ULRICH, J., M. CALVIN
Biochim. et Biophys. Acta, 63: 1, 1962.
Zit. nach J. Kühnau, Ernährungsphysiol. Gesichtspunkte. Wissensch. Veröffentl. d. D. Gesellsch. f. Ernährung, 12, 1964
118. VAHLENSIECK, W., D. WÜLFING, W. KOCH
Probleme der Nierentransplantation. Brun's Beiträge zur klinischen Chirurgie, 208, 1: 32, 1964
119. VAITKEVICIUS, V. K., M. SUGIMOTO, M. L. REED, M. J. BRENNAN
Autologous transplantation of enzymatically prepared and freeze-preserved human tumors. Cancer, 17, 5: 666, 1964
120. VALERI, C. R., M. E. HENDERSON
Recent difficulties with frozen glycerolized blood. J. Amer. Med. Ass., 188: 1125, 1964
121. WALLACH, St., J. W. ZEMP, J. A. CAVINS, L. J. JENKINS jr., M. BETHEA, L. FRESHETTE, L. L. HAYNES, J. L. TULLIS
Cation flux and electrolyte composition of frozen-deglycerolized blood. Blood, 20, 3: 344, 1962
122. WEISS, L., J. A. ARMSTRONG
Structural changes in mammalian cells associated with cooling to -79°C . J. Biophys. Biochem. Cytology, 7: 673, 1960
123. WEISS, P., A. C. TAYLOR
Histomechanical analysis of nerve reunion in the rat after tubular splicing. Arch. Surg., 47: 419, 1943
124. WHEELER, T. E., E. D. THOMAS, T. MALININ
A method for freezing rat kidney in situ. Transplantation, 2, 4: 534, 1964
125. WILDER, R. J., B. F. RUSH, Y. YAYCIOGLU, M. M. RAVITCH
Survival and physiologic studies with profound hypothermia (0° to 8°C .) and a pump-oxygenator in dogs. Surgery, 49, 5: 629, 1961

126. WILLIAMS, R. C.

The application of freeze-drying to electron microscopy. In: Biol. Appl. Ed. by R. J. C. Harris, N. Y. Acad. Press, 303, 1954

LEBENS LAUF

Am 25. Mai 1942 wurde ich als ältestes Kind des Architekten Ernst vor dem Brocke und seiner Frau Maria geb. Ferber in Soest/Westf. geboren. Ostern 1948 trat ich in die Patroklischule in Soest ein und besuchte ab Ostern 1952 das Neusprachliche Mädchengymnasium in Soest. Dort legte ich am 23. Februar 1961 die Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium begann ich an der Universität Münster, an der ich am 24. April 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 14. Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand. Das klinische Studium begann ich im WS 1963/64 an der Universität München und setzte es im SS 1964 an der Universität Wien fort. Im WS 1964/65 studierte ich an der Universität Würzburg und immatrikulierte mich im SS 1965 wieder an der Universität München. Dort beendete ich das klinische Studium. Am 15. Februar 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

